



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201734204 A

(43) 公開日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 01 日

(21) 申請案號：105144320 (22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 12 月 30 日

(51) Int. Cl. : C12N5/0783 (2010.01) A61K35/17 (2015.01)
A61P35/00 (2006.01)(30) 優先權：2015/12/30 美國 62/272,969
2016/12/29 世界智慧財產權組織 PCT/US16/069269

(71) 申請人：安瑟吉納西斯公司 (美國) ANTHROGENESIS CORPORATION (US)

美國

梁 碧濤 (美國) LIANG, BITAO (US)

美國

呂筱華 (中國大陸) LU, XIAOHUA (CN)

中國大陸

劉蔚 (中國大陸) LIU, WEI (CN)

中國大陸

卡拉西斯維茲 曼德茲 凱西 E (波蘭) KARASCIEWICZ-MENDEZ, KATHY E.

(PL)

波蘭

維維 克里斯多夫 (美國) WIWI, CHRISTOPHER (US)

美國

夏和 庫堤 (美國) SHAH, KRUTI (US)

美國

(72) 發明人：梁 碧濤 LIANG, BITAO (US)；呂筱華 LU, XIAOHUA (CN)；劉蔚 LIU, WEI (CN)；卡拉西斯維茲 曼德茲 凱西 E KARASCIEWICZ-MENDEZ, KATHY E. (PL)；維維 克里斯多夫 WIWI, CHRISTOPHER (US)；夏和 庫堤 SHAH, KRUTI (US)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：47 項 圖式數：29 共 130 頁

(54) 名稱

T 淋巴球生產方法及由此製得的 T 淋巴球

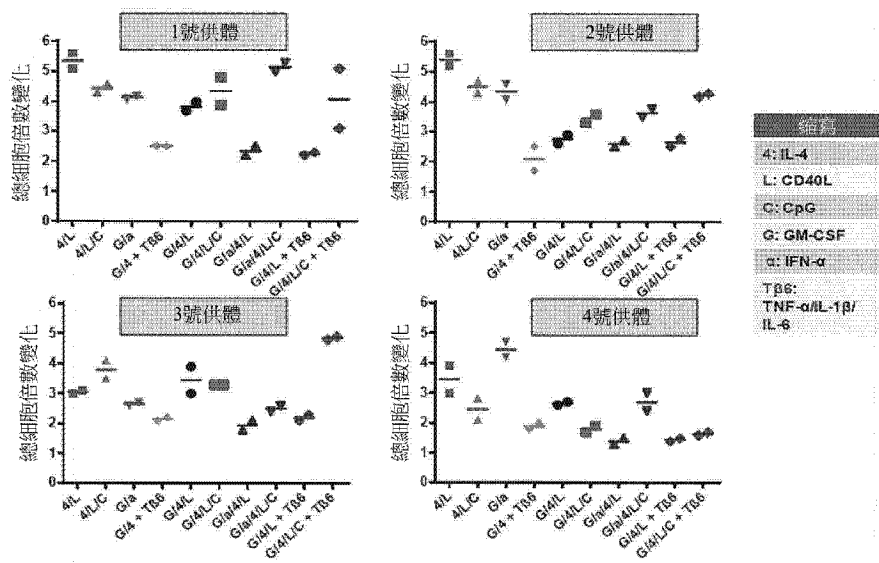
T LYMPHOCYTE PRODUCTION METHODS AND T LYMPHOCYTES PRODUCED THEREBY

(57) 摘要

本發明提供產生例如細胞毒性 T 淋巴球之 T 細胞之方法，該方法在沒有分開產生及分離抗原呈遞細胞之步驟的情況下，且在單次之抗原刺激下，自外周血液單核細胞開始進行。本文亦提供使用該等細胞毒性 T 淋巴球來例如治療癌症及/或病毒感染之方法。

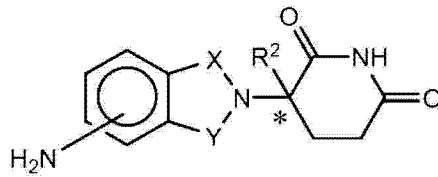
Provided herein are methods of generating T cells, e.g., cytotoxic T lymphocytes starting from peripheral blood mononuclear cells without a separate step of generating and isolating antigen-presenting cells, and with a single round of antigen stimulation. Also provided herein are methods of using said cytotoxic T lymphocytes, for example, to treat cancer and/or viral infection.

指定代表圖：



【圖1】

特徵化學式：



【發明說明書】

【中文發明名稱】

T淋巴球生產方法及由此製得的T淋巴球

【英文發明名稱】

T LYMPHOCYTE PRODUCTION METHODS AND T
LYMPHOCYTES PRODUCED THEREBY

【技術領域】

本文之揭示內容係關於免疫學領域，且更特定言之，係關於抗原特異性T淋巴球之產生及其使用方法。

【先前技術】

離體產生抗原特異性T細胞(例如細胞毒性T淋巴球(CTL))涉及例如跟隨有T細胞增殖的T細胞抗原特異性活化。此類T細胞之完全活化涉及T細胞受體(TCR)與藉由抗原呈遞細胞(APC)呈遞之同源MHC-肽複合物之連接，及共刺激分子在T細胞與APC之間的連接，該等抗原呈遞細胞包括樹突狀細胞(DC)、巨噬細胞及B細胞。有時，無細胞MHC-肽複合物用於代替藉由APC呈遞之MHC-肽複合物。若共刺激活化為缺陷型的，則T細胞將經部分激活，經歷細胞凋亡或進入因應性缺失狀態。

B細胞及單核細胞通常均表現為MHC-肽複合物形成所需之HLA分子，但缺乏共刺激分子(諸如CD80及CD86)之高表現。在不進一步活化或成熟而獲得完全活化之APC的情況下，可能發生不合格或次最佳之抗原特異性T細胞激活及擴增。因此，藉由產生來自前體單核細胞之成熟樹突狀細胞(mDC)或經活化B細胞，在離體之抗原特異性T細胞激活之前，通常需要單獨之APC誘導及分離步驟。

【發明內容】

本文提供產生抗原特異性T細胞(例如細胞毒性T淋巴球(T細胞))之方法，該方法在無產生且分離抗原呈遞細胞(諸如樹突狀細胞、巨噬細胞及B細胞)之單獨步驟的情況下，且在單次之抗原刺激下，自外周血液單核細胞開始進行。

在一個態樣中，本文提供生產包含抗原特異性T細胞(例如CTL)之細胞群體的方法，其包含以下步驟：(a)自個體分離血液單核細胞，例如外周血液單核細胞(PBMC)或臍帶血單核細胞；(b)在抗原呈遞細胞(APC)誘導培養基中，培養該等血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)以生產第一細胞群體，該抗原呈遞細胞誘導培養基包含介白素4 (IL-4)及可溶性CD40配位體(sCD40L)及/或包含粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)及干擾素，例如干擾素 α (IFN- α)；(c)在一或多種抗原存在下培養第一細胞群體，以生產第二細胞群體；及(d)在包含介白素7 (IL-7)、介白素15 (IL-15)及視情況IL-4之T細胞擴增培養基中，培養第二細胞群體，以生產第三細胞群體；其中第三細胞群體包含為CD3+且對步驟(c)中所添加之抗原具有特異性之T細胞。在某些態樣中，該方法進一步包含如下步驟：在包含IL-7及IL-15但不包含IL-4之第二T細胞擴增培養基中培養第三細胞群體，以產生第四細胞群體；其中第四細胞群體包含為CD3+且對步驟(c)中所添加之抗原具有特異性之T細胞。在某些態樣中，該方法進一步包含自第三細胞群體或第四細胞群體分離為CD3+之T細胞之步驟。在某些態樣中，步驟(c)在APC誘導培養基中進行。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含IL-4。在某些態樣中，個體為人類。在某些態樣中，抗原為人類抗原。在某些態樣中，抗原為全長蛋白質。在某些態樣中，抗原為蛋白質片

段。在某些態樣中，抗原為表示蛋白質之一部分之肽。在某些態樣中，APC產生來自外源性遺傳物質之抗原。

在某些態樣中，第三細胞群體包含另外為CD4⁺之T細胞。在某些態樣中，第三細胞群體包含另外為CD8⁺之T細胞。在某些態樣中，第三細胞群體包含另外為CD4⁺及CD8⁺之T細胞。

在某些態樣中，第四細胞群體包含另外為CD4⁺之T細胞。在某些態樣中，第四細胞群體包含另外為CD8⁺之T細胞。在某些態樣中，第四細胞群體包含另外為CD4⁺及CD8⁺之T細胞。

在某些態樣中，APC誘導培養基包含IL-4及sCD40L。在某些態樣中，APC誘導培養基包含1-50 ng/mL IL-4及0.1-5 µg/mL sCD40L。在某些態樣中，APC誘導培養基包含8-12 ng/mL IL-4及0.8-1.2 µg/mL sCD40L。在某些態樣中，APC誘導培養基包含10 ng/mL IL-4及1 µg/mL sCD40L。

在某些態樣中，APC誘導培養基進一步包含具有一或多個未甲基化之CpG二核苷酸基元之合成寡核苷酸。在某些態樣中，APC誘導培養基進一步包含GM-CSF及IFN- α 。在某些態樣中，APC誘導培養基基本上由GM-CSF及IFN- α 組成。

在某些態樣中，該一或多種抗原為肽(例如凍乾肽)集合庫或含於其內。在特定態樣中，凍乾肽集合庫涵蓋人類HPV16E6、HPV16E7、HPV18E6及/或HPV18E7蛋白質之序列。在特定態樣中，肽之濃度為1 µg/mL。

在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含10-100 ng/mL IL-7、2-20 ng/mL IL-15及10-100 ng/mL IL-4。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包

含40-60 ng/mL IL-7、7-11 ng/mL IL-15及45-65 ng/mL IL-4。在特定態樣中，T細胞擴增培養基包含50 ng/mL IL-7、9 ng/mL IL-15及55 ng/mL IL-4。

在某些態樣中，第二T細胞擴增培養基包含10-100 ng/mL IL-7及2-20 ng/mL IL-15。在某些態樣中，第二T細胞擴增培養基包含40-60 ng/mL IL-7及7-11 ng/mL IL-15。在特定態樣中，第二T細胞擴增培養基包含50 ng/mL IL-7及9 ng/mL IL-15。

在某些態樣中，步驟(b)之持續時間為1-3天。在特定態樣中，步驟(b)之持續時間為1天。在某些態樣中，步驟(d)之持續時間為8-16天。在特定態樣中，步驟(d)之持續時間為12天。

在某些態樣中，血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)自全血、白血球層或富集之白血球清除術產物(leukapheresis product)分離。在某些態樣中，血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)以 $4-6 \times 10^6$ 個/平方公分之密度接種於APC誘導培養基中。在特定態樣中，血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)以 5×10^6 個/平方公分之密度接種。在特定態樣中，血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)以大於 5×10^6 個/平方公分之密度接種。

在某些態樣中，抗原特異性CD3+細胞藉由胞內細胞介素染色(ICCS)來鑑別或藉由ICCS其為可鑑別的。在某些態樣中，培養步驟在氣體可滲透殼體(例如G-REX®裝置)中進行。在某些態樣中，一或多個培養步驟在T燒瓶中進行。在某些態樣中，一或多個培養步驟在袋子中進行。在特定態樣中，袋子為靜態袋。在某些態樣中，袋子為氣體可滲透的。在某些態樣中，一或多個培養步驟在WAVE™生物反應器(GE Healthcare Life

Sciences)中進行。在某些態樣中，一或多個培養步驟在旋轉燒瓶中進行。

在一個態樣中，本文提供抗原特異性T細胞群體，其藉由包含以下步驟之方法生產：(a)自個體分離血液單核細胞，例如PBMC或臍帶血單核細胞；(b)在抗原呈遞細胞(APC)誘導培養基中培養該等血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)以生產第一細胞群體，該抗原呈遞細胞誘導培養基包含介白素4 (IL-4)及可溶性CD40配位體(sCD40L)及/或包含粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)及干擾素 α (IFN- α)；(c)在一或多種抗原存在下培養第一細胞群體，以生產第二細胞群體；及(d)在包含介白素7 (IL-7)、介白素15 (IL-15)及IL-4之T細胞擴增培養基中培養第二細胞群體，以生產第三細胞群體；其中第三細胞群體包含為CD3+且對步驟(c)中所添加之抗原具有特異性之T細胞。在某些態樣中，細胞群體藉由進一步包含如下步驟之方法生產：在包含IL-7及IL-15但不包含IL-4之第二T細胞擴增培養基中培養第三細胞群體，以產生第四細胞群體；其中第四細胞群體包含為CD3+且對步驟(c)中所添加之抗原具有特異性之T細胞。在某些態樣中，細胞群體藉由進一步包含如下步驟之方法生產：自第三細胞群體或第四細胞群體分離為CD3+之T細胞。在某些態樣中，步驟(c)在APC誘導培養基中進行。

在一個態樣中，本文提供包含本文所描述之抗原特異性T細胞之組合物，例如醫藥組合物。在某些態樣中，組合物中0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%或45%或更多之細胞為抗原特異性T細胞。在某些態樣中，組合物中50%之細胞為抗原特異性T細胞。在某些

態樣中，組合物包含醫藥學上可接受之賦形劑。

在一個態樣中，本文提供治療癌症或病毒感染之方法，其包含向有需要患者投與藉由本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞群體，其中分離之血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)為患者自體的。在另一態樣中，本文提供治療癌症或病毒感染之方法，其包含向有需要患者投與藉由本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞群體，其中分離之血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)不為患者自體的。在某些態樣中，病毒感染為人類乳突狀瘤病毒(HPV)感染。在某些態樣中，病毒感染為HPV感染且抗原為HPV抗原。在某些其他態樣中，病毒感染為埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus, EBV)感染。在某些態樣中，病毒感染為EBV感染且抗原為EBV抗原。在前述實施例之一特定實施例中，抗原在包含病毒感染之腫瘤細胞中表現。在某些態樣中，本文提供向有需要之患者投與抗原特異性T細胞群體之方法。在某些態樣中，該方法進一步包含向該患者投與免疫調節藥物或表觀遺傳修飾劑。在特定態樣中，該方法進一步包含向該患者投與免疫檢查點抑制劑。在更特定態樣中，免疫檢查點抑制劑選自由抗CTLA-4抗體、抗PD1抗體及抗PD-L1抗體組成之群。

在一個態樣中，本文提供治療癌症之方法，其包含向有需要患者投與藉由本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞群體，其中分離之血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)為患者自體的。在某些態樣中，癌症為HPV陽性(HPV+)癌症。在某些態樣中，HPV+癌症為頭頸癌。在某些態樣中，頭頸癌為頭頸部鱗狀細胞癌。在某些態樣中，頭頸癌為口咽癌。在某些態樣中，HPV+癌症為陰莖癌。在某些態樣中，HPV+癌症為宮頸癌。在某些態樣中，HPV+癌症為肛門癌。在某些態樣中，HPV+癌

症為外陰癌。在某些態樣中，HPV+癌症為陰道癌。在某些態樣中，HPV+癌症為肺癌。在某些態樣中，HPV+癌症為轉移性的。在某些態樣中，HPV+癌症為復發性的。在某些態樣中，HPV+癌症為轉移性及復發性的。在某些態樣中，該方法進一步包含向該患者投與免疫調節藥物或表觀遺傳修飾劑。在某些態樣中，該方法進一步包含向該患者投與免疫檢查點抑制劑。在某些態樣中，免疫檢查點抑制劑選自由抗CTLA-4抗體、抗PD1抗體及抗PD-L1抗體組成之群。

【圖式簡單說明】

圖1：在描述於實例1中之各種APC誘導細胞介素條件下，所有供體細胞之擴增倍數變化。

圖2：在描述於實例1中之各種APC誘導細胞介素條件下，所有供體之HPV T細胞頻率。

圖3：在描述於實例1中之各種APC誘導細胞介素條件下，所有供體之HPV T細胞產量。

圖4A-B：在描述於實例2中之各種T細胞擴增細胞介素條件下，收集時之總細胞擴增倍數。(A)所有4個供體之概述圖。(B)各供體之個別圖。

圖5A-B：在描述於實例2中之各種T細胞擴增細胞介素條件下，收集時之T細胞頻率。(A)所有4個供體之概述圖。(B)各供體之個別圖。

圖6A-B：在描述於實例2中之各種T細胞擴增細胞介素條件下，收集時之T細胞產量。(A)所有4個供體之概述圖。(B)各供體之個別圖。

圖7：在描述於實例2中之各種T細胞擴增細胞介素條件下，兩個不同供體之CD45RO+T細胞群體內之Tcm、Tem及Teff百分比。各群體(Tcm、Tem及Teff)之回合C1-C17自左至右以數字順序展示。

圖8：在描述於實例2中之各種T細胞擴增細胞介素條件下，兩個不同供體之CD45RO+CD62Lhi T細胞群體。

圖9：在描述於實例3中之各種APC誘導持續時間條件下，所有供體細胞之擴增倍數變化。

圖10：在描述於實例3中之各種APC誘導持續時間條件下，所有供體之HPV-T細胞頻率。

圖11：在描述於實例3中之各種APC誘導持續時間條件下，所有供體之HPV T細胞產量。

圖12：描述於實例4中之條件下之細胞生長曲線及倍增時間。

圖13A-B：在描述於實例4中之條件下，隨著擴增延長細胞活力(A)及細胞大小(B)之變化。

圖14A-D：在描述於實例4中之條件下，在抗原刺激後第12、14及16天收集時之總細胞擴增(A)、倍數變化(B)、T細胞頻率(C)及T細胞產量(D)。

圖15：在描述於實例4中之條件下，第12天至第16天收集時之T細胞純度及CD4/CD8細胞百分比。

圖16：在描述於實例4中之條件下，第12天至第16天收集時之非T細胞群體。

圖17：在描述於實例4中之條件下，隨著培養延長記憶T細胞及CD45RO+CD62Lhi百分比之變化。統計顯著性由單因子ANOVA分析確定。

圖18：在描述於實例4中之條件下，12天至16天，隨著培養延長中央記憶T細胞群體、效應記憶T細胞群體及效應T細胞群體之百分比的變化。

在CD45RO+群體內，自第12天至第16天培養看出中央記憶T細胞群體之減少及效應T細胞群體之升高。統計顯著性由單因子ANOVA分析確定。

圖19：在描述於實例5中之各種接種密度及APC細胞介素混合物濃度條件下，所有供體之HPV T細胞頻率。

圖20：在描述於實例5中之各種接種密度及APC細胞介素混合物濃度條件下，所有供體之HPV T細胞產量。

圖21：在描述於實例6中之條件下，所有供體之細胞擴增倍數變化。用x軸處之APC誘導培養基類型對結果進行分組。圖式之圖例展示在右下角。「IL-4 Disc.」意謂IL-4中斷。

圖22：在描述於實例6中之條件下，所有供體之HPV T細胞頻率。用x軸處之APC誘導培養基類型對結果進行分組。圖式之圖例展示在右下角。「IL-4 Disc.」意謂IL-4中斷。

圖23：在描述於實例6中之條件下，所有供體之HPV T細胞產量。用x軸處之APC誘導培養基類型對結果進行分組。圖式之圖例展示在右下角。「IL-4 Disc.」意謂IL-4中斷。

圖24：在描述於實例6中之條件下，所有供體之IFN- γ -HPV T細胞頻率。用x軸處之APC誘導培養基類型對結果進行分組。圖式之圖例展示在右下角。「IL-4 Disc.」意謂IL-4中斷。自在CD3+群體內設門之細胞獲得結果。

圖25：在描述於實例6中之條件下，基於所有供體之細胞介素分泌之Th1/Th2的比率。呈現IFN- γ 含量、IL-5含量及呈Th1/Th2比率之形式的IFN- γ /IL-5比率。用x軸處之APC誘導培養基類型對結果進行分組。圖式之圖例展示在底部。「IL-4 Disc.」意謂IL-4中斷。

圖26：在描述於實例6中之條件下，基於所有供體之轉錄因子表現之Th1、Th2、Treg子集分析。用x軸處之APC誘導培養基類型對結果進行分組。在右邊展示圖式之圖例。D#1：1號供體；D#2：2號供體；D#3：3號供體。「IL-4 Conc.」意謂IL-4延續。「IL-4 Disc.」意謂IL-4中斷。

圖27：T細胞由五名宮頸癌患者產生，一個HPV 16及HPV 18陽性之健康供體，及三個HPV狀態未知之健康供體。隨後T細胞用HPV 16或HPV 18 E6或E7抗原肽或來自HPV 16及HPV 18兩者之E6及E7抗原肽活化，且量測T細胞之百分比。

圖28A-B：在2.5:1、5:1、10:1、20:1及40:1之效應子與標靶之比率下，活體外測試T細胞之針對自體標靶或HLA-A2匹配之標靶的細胞毒性。

圖29A-D：在T細胞產生之前(PBMC)及之後(T細胞)，測試七個個別供體之細胞。藉由量測CD137之表面表現來測試HPV抗原特異性(圖29A)。藉由量測IFN- γ (圖29B)、GM-CSF (圖29C)及TNF- α (圖29D)之分泌，在HPV刺激之PBMC及HPV或非HPV刺激之T細胞中量測效應子活性。

【實施方式】

本申請案主張2015年12月30日申請之美國臨時專利申請案第62/272,969號之權益，該申請案之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

本文提供產生T細胞(例如細胞毒性T淋巴球(T細胞))之方法，該方法在無產生且分離抗原呈遞細胞(諸如樹突狀細胞、巨噬細胞及B細胞)之單獨步驟的情況下，且在單次之抗原刺激下，自血液單核細胞(例如PBMC)

或臍帶血單核細胞開始進行。如本文所使用，術語「T細胞」意謂T淋巴球，且包括細胞毒性T淋巴球(T細胞)。

表1. 關鍵術語縮寫之清單

術語	全稱
AE	不良事件
APC	抗原呈遞細胞
CBA	細胞珠粒陣列
CTL	細胞毒性T淋巴球
Cy	環磷醯胺
DC	樹突狀細胞
DLT	劑量限制性毒性
DMSO	二甲亞砜
Flu	氟達拉濱(fludarabine)
GM-CSF	粒細胞-巨噬細胞
HPV	人類乳突狀瘤病毒
ICCS	胞內細胞介素染色
iDC	不成熟之樹突狀細胞
IFN- α	干擾素 α
IFN- γ	干擾素 γ
IL-10	介白素10
IL-13	介白素13
IL-15	介白素15
IL-1 β	介白素1 β
IL-2	介白素2
IL-4	介白素4
IL-5	介白素5
IL-6	介白素6
IL-7	介白素7
IM	肌內
IMDM	經伊斯科夫氏改良之杜爾貝科氏 (Iscove's Modified Dulbecco's)培養基
IV	靜脈內
mDC	成熟之樹突狀細胞
MTD	最大耐受劑量
OS	整體存活率
PBMC	外周血液單核細胞
PBS	磷酸鹽緩衝鹽水
pDC	漿細胞樣DC
PHA	植物血球凝集素
PD	進行性疾病

PFS	無進展存活
PO	經口
RPMI	羅斯維公園紀念所 (Roswell Park Memorial Institute)
RT	室溫
SCCHN	頭頸部鱗狀細胞癌
sCD40L	可溶性CD40配位體
TNF-α	腫瘤壞死因子 α

5.1 T細胞及T細胞群體之生產

在一個態樣中，本文提供生產包含抗原特異性T細胞(細胞毒性T淋巴球(例如CTL))之細胞群體的方法，其包含以下步驟：(a)自個體分離血液單核細胞，例如PBMC或臍帶血單核細胞；(b)在抗原呈遞細胞(APC)誘導培養基中，培養該等血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)以生產第一細胞群體，該抗原呈遞細胞誘導培養基包含介白素4 (IL-4)及可溶性CD40配位體(sCD40L)及/或包含粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)及干擾素 α (IFN- α)；(c)在一或多種抗原存在下培養第一細胞群體，以生產第二細胞群體；及(d)在包含介白素7 (IL-7)、介白素15 (IL-15)及視情況IL-4之T細胞擴增培養基中，培養第二細胞群體，以生產第三細胞群體；其中第三細胞群體包含為CD3+且對步驟(c)中所添加之抗原具有特異性之T細胞。在某些態樣中，該方法進一步包含如下步驟:在包含IL-7及IL-15但不包含IL-4之第二T細胞擴增培養基中培養第三細胞群體，以產生第四細胞群體；其中第四細胞群體包含為CD3+且對步驟(c)中所添加之抗原具有特異性之T細胞。在某些態樣中，該方法進一步包含自第三細胞群體或第四細胞群體分離為CD3+之T細胞之步驟。在某些態樣中，步驟(c)在APC誘導培養基中進行。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含IL-4。在某些態樣中，個體為人類。在某些態樣中，抗原為人類抗原。在某些態樣中，抗原為全長蛋白質。在某些態樣中，抗原為蛋白質片段。在某些態

樣中，抗原為表示蛋白質之一部分之肽。在某些態樣中，APC產生來自外源性遺傳物質之抗原。在某些態樣中，重複一或多個步驟以便增加由彼等一或多個步驟產生之靶標細胞群體之產量。在某些態樣中，用一步驟後保持未經改造之細胞重複該步驟。在某些態樣中，用在一或多個步驟後保持未經改造之細胞重複該等步驟。在某些態樣中，重複步驟(b)至(d)一次。在某些態樣中，重複步驟(b)至(d)兩次。在某些態樣中，重複步驟(b)至(d)三次。在某些態樣中，重複步驟(b)至(d)四次。在某些態樣中，重複步驟(b)至(d)五次。在某些態樣中，用步驟(d)後保留的血液單核細胞(例如PBMC)或臍帶血單核細胞重複步驟(b)至(d)。在某些態樣中，重複步驟(b)、(c)及(d)中之一或多者一次、兩次、三次、四次或五次。

在某些態樣中，第三細胞群體包含另外為CD4⁺之T細胞。在某些態樣中，第三細胞群體包含另外為CD8⁺之T細胞。在某些態樣中，第三細胞群體包含另外為CD4⁺及CD8⁺之T細胞。

在某些態樣中，第四細胞群體包含另外為CD4⁺之T細胞。在某些態樣中，第四細胞群體包含另外為CD8⁺之T細胞。在某些態樣中，第四細胞群體包含另外為CD4⁺及CD8⁺之T細胞。

在某些態樣中，APC誘導培養基包含IL-4及sCD40L。在某些態樣中，APC誘導培養基包含1-50 ng/mL IL-4及0.1-5 µg/mL sCD40L。在某些態樣中，APC誘導培養基包含8-12 ng/mL IL-4及0.8-1.2 µg/mL sCD40L。在某些態樣中，APC誘導培養基包含10 ng/mL IL-4及1 µg/mL sCD40L。

在某些態樣中，APC誘導培養基進一步包含具有一或多個未甲基化之CpG二核苷酸基元之合成寡核苷酸。在某些態樣中，APC誘導培養基進

一步包含GM-CSF及IFN- α 。在某些態樣中，APC誘導培養基包含GM-CSF及IFN- α 。在某些態樣中，APC誘導培養基基本上由GM-CSF及IFN- α 組成。

在某些態樣中，APC誘導培養基進一步包含IMDM、2-巰基乙醇、Pen Strep及/或人類血清。在某些態樣中，APC誘導培養基進一步包含RPMI-1640、克里克氏培養基(Click's media)、人類血清、L-GLUTAMAXTM (Life Technologies)、Pen Strep及/或2-巰基乙醇。在某些態樣中，APC誘導培養基進一步包含RPMI-1640、克里克氏培養基、人類血清、麩醯胺酸、Pen Strep及/或2-巰基乙醇。

在某些態樣中，APC誘導培養基中之IL-4之濃度為40 ng/mL。在某些態樣中，APC誘導培養基中之IL-4之濃度為10 ng/mL。在某些態樣中，APC誘導培養基中之CD40L之濃度為1 μ g/mL。在某些態樣中，APC誘導培養基中之CpG二核苷酸基元之濃度為4 μ g/mL。在某些態樣中，APC誘導培養基中之GM-CSF之濃度為800 U/mL。在某些態樣中，APC誘導培養基中之IFN- α 之濃度為1000 U/mL。

在某些態樣中，該一或多種抗原為肽集合庫，例如凍乾肽集合庫。在某些態樣中，該一或多種抗原為HPV肽混合物，例如PEPMIXTM。在某些態樣中，該一或多種抗原為與跨越16及18型HPV之E6及E7蛋白質的15基體重疊之集合庫。在特定態樣中，肽集合庫涵蓋人類HPV16E6、HPV16E7、HPV18E6及/或HPV18E7蛋白質中之一或多者或所有者之序列。在某些態樣中，該一或多種抗原包含來自單一病毒(例如僅來自HPV16或僅來自HPV18)之一或多種抗原。在某些態樣中，肽之濃度為0.5-1 μ g/mL。在特定態樣中，肽之濃度為1 μ g/mL。在特定態樣中，肽

之濃度為0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含10-100 ng/mL IL-7、2-20 ng/mL IL-15及10-100 ng/mL IL-4。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含40-60 ng/mL IL-7、7-11 ng/mL IL-15及45-65 ng/mL IL-4。在特定態樣中，T細胞擴增培養基包含50 ng/mL IL-7、9 ng/mL IL-15及55 ng/mL IL-4。在某些態樣中，在添加該一或多種抗原後，細胞介素自T細胞擴增培養基之添加進行2小時、24小時或48小時。在特定態樣中，在添加該一或多種抗原後，細胞介素自T細胞擴增培養基之添加進行2小時。在特定態樣中，在添加該一或多種抗原後，細胞介素自T細胞擴增培養基之添加進行24小時。在特定態樣中，在添加該一或多種抗原後，細胞介素自T細胞擴增培養基之添加進行48小時。

在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含1 ng/mL IL-15、15 ng/mL IL-4及10 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含1 ng/mL IL-15、15 ng/mL IL-4及50 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含1 ng/mL IL-15、35 ng/mL IL-4及30 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含1 ng/mL IL-15、55 ng/mL IL-4及10 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含1 ng/mL IL-15、55 ng/mL IL-4及50 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含5.5 ng/mL IL-15、15 ng/mL IL-4及10 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含5.5 ng/mL IL-15、15 ng/mL IL-4及50 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含5.5 ng/mL IL-15、35 ng/mL IL-4及30 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含5.5 ng/mL IL-15、55 ng/mL IL-4及10 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含5.5 ng/mL

IL-15、55 ng/mL IL-4及50 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含10 ng/mL IL-15、15 ng/mL IL-4及10 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含10 ng/mL IL-15、15 ng/mL IL-4及50 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含10 ng/mL IL-15、35 ng/mL IL-4及30 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含10 ng/mL IL-15、55 ng/mL IL-4及10 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含10 ng/mL IL-15、55 ng/mL IL-4及50 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含55 ng/mL IL-4及50 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含5.5 ng/mL IL-15及50 ng/mL IL-7。在某些態樣中，T細胞擴增培養基基本上由5.5 ng/mL IL-15及50 ng/mL IL-7組成。

在某些態樣中，第二T細胞擴增培養基包含10-100 ng/mL IL-7及2-20 ng/mL IL-15。在某些態樣中，第二T細胞擴增培養基包含40-60 ng/mL IL-7及7-11 ng/mL IL-15。在特定態樣中，第二T細胞擴增培養基包含50 ng/mL IL-7及9 ng/mL IL-15。

在某些態樣中，步驟(b)之持續時間為1-3天。在特定態樣中，步驟(b)之持續時間為1天。在某些態樣中，步驟(d)之持續時間為8-16天。在特定態樣中，步驟(d)之持續時間為12天。在某些態樣中，IL-4在結束T細胞擴增之前自T細胞擴增培養基移除。在某些態樣中，IL-4在結束T細胞擴增之前不自T細胞擴增培養基移除。

在某些態樣中，血液單核細胞(例如PBMC)自全血、白血球層或富集之白血球清除術產物分離。在某些態樣中，血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)以 $4-6 \times 10^6$ 個/平方公分之密度接種於APC誘導培養基

中。在特定態樣中，血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)以 5×10^6 個/平方公分之密度接種。在特定態樣中，血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)以大於 5×10^6 個/平方公分之密度接種。

在某些態樣中，抗原特異性CD3+細胞藉由胞內細胞介素染色(ICCS)鑑別。在某些態樣中，培養步驟在氣體可滲透容器(例如塑膠袋或G-REX®裝置)中進行。在某些態樣中，一或多個培養步驟在T燒瓶中進行。在某些態樣中，一或多個培養步驟在袋子中進行。在特定態樣中，袋子為靜態袋。在某些態樣中，袋子為氣體可滲透的。在某些態樣中，一或多個培養步驟在WAVE™生物反應器中進行。在某些態樣中，一或多個培養步驟在旋轉燒瓶中進行。

5.2 T細胞之分離及表徵

分離T細胞之方法為此項技術中已知且可用以分離(例如純化)使用本文所描述之方法生產之T細胞。舉例而言，T細胞可藉由使用針對CD3之抗體使細胞染色(在一個實施例中)且選擇CD3+細胞來分離或富集。T細胞亦可使用針對CD4及/或CD8之抗體且選擇CD4+及/或CD8+細胞來分離。T細胞(例如藉由本文所描述之方法生產之T細胞)亦可藉由移除細胞群體中之不為T細胞的細胞來分離或富集，該細胞群體包含T細胞，例如藉由本文所描述之方法生產之T細胞。舉例而言，T細胞(例如使用本文所描述之方法生產之細胞)可藉由將呈現非T細胞標記物之細胞耗盡而分離或富集。可進一步對藉由此等方法分離之細胞進行分選。

抗原特異性T細胞(例如抗原特異性CTL，例如HPV特異性T細胞及CTL)可例如使用ICCS分析來鑑別，該ICCS分析為偵測細胞刺激後內質網內之細胞介素之產生及積聚的基於流式細胞測量術之分析。ICCS可與其

他流式細胞測量術方案組合使用，以用於使用細胞表面標記物來偵測T細胞之抗原反應性的免疫表型。在特定實施例中，ICCS分析用以量測抗原特異性T細胞(例如HPV T細胞)，T細胞之培養過程之各個時間點下的頻率。ICCS經由以下原理想工作：1)抗原特異性T細胞可藉由相同之特異性抗原再刺激來活化，2)回應於抗原特異性再刺激，T細胞可產生細胞介素(諸如IFN- γ 、TNF- α 、IL-2等)且表現活化標記物(諸如CD154、CD137等)，3)在再刺激期間添加蛋白質轉運之抑制劑(例如布雷菲爾德菌素A (brefeldin A))，以將細胞介素保留在細胞內，4)隨後將細胞用多聚甲醛固定且滲透，及5)添加抗細胞介素抗體且藉由可流式細胞儀分析所述細胞。

因為T細胞將回應於除抗原特異性刺激以外之廣泛多種刺激信號而活化，因此當使用ICCS時陽性染色(尤其低強度染色)不明確地顯示真實之抗原特異性。因此，在一個實施例中，將非抗原刺激對照連同特異性抗原刺激條件一起設定。抗原特異性(例如HPV) T細胞之數目藉由量測具有細胞介素產生或經上調活化標記物中之至少一者的T細胞，且減去非抗原刺激對照之數目而計數。在某些實施例中，用於流式細胞測量術之組為6標記物組，包括CD3、CD4、CD8、CD154 (CD40L)、IFN- γ 及TNF- α 。CD3、CD4及CD8為可定義總T細胞群體(視需要包括天然殺手T (NKT)細胞)及CD4/CD8 T細胞比率之T細胞譜系標記物。IFN- γ 及TNF- α 為T細胞在隔夜再活化後產生之細胞介素。CD154為在新的抗原活化之T細胞中上調之T細胞活化標記物。

可例如使用包含針對CD19、CD56、CD3、CD11a、CD4及CD8之抗體之T細胞純度組進行T細胞之確定及/或分離。可使用包含針對CD3、CD62L、CD4、CD27、CCR7及CD45RO之抗體之T細胞分化組來確定及/

或分離某一分化階段下之T細胞。為確定細胞是否包含T細胞，亦可例如藉由8叢細胞基質珠粒陣列(8-plex cytotoxicity beads array, CBA)來量測分泌之細胞介素。該組可包括選自由以下組成之群的一或多個細胞介素集合：Th1細胞介素(例如IL-2、IFN- γ 及TNF- α)、Th2細胞介素(例如IL-5、IL-13)、Treg細胞介素(例如IL-10)及與T細胞效應功能相關之細胞介素(例如顆粒酶B及GM-CSF)為確定細胞是否包含T細胞，可量測轉錄因子，例如T-bet、GATA-3及FoxP3中之一或多者。

細胞分離，例如自非T細胞分離藉由本文所描述之方法生產之T細胞，可藉由例如流式細胞測量術、螢光活化細胞分選(FACS)或在一個實施例中使用結合有特異性抗體之微珠粒的磁性細胞分選來實現。可例如使用磁活化細胞分選(MACS)技術來分離細胞，該MACS技術為基於粒子結合包含一或多種特異性抗體(例如抗CD3抗體)之磁性珠粒(例如約0.5-100 μm 直徑)之能力來分離粒子之方法。可使用例如AUTOMACS™分離器(Miltenyi)或CLINIMACS®系統(Miltenyi)來進行磁性細胞分離且使其自動化。可對磁性微球體進行多種適用修飾，包括共價添加特異性識別特定細胞表面分子或半抗原之抗體。隨後使珠粒與細胞混合以允許結合。隨後使細胞通過磁場以分離出具有特定特異性細胞表面標記物之細胞。在一個實施例中，隨後可分離此等細胞且使其再與偶合至針對其他細胞表面標記物之抗體的磁性珠粒混合。使細胞再次通過磁場，分離結合兩種抗體之細胞。隨後可將此類細胞稀釋至分開盤(諸如微量滴定盤)中以用於純系分離。

5.3 T細胞及T細胞群體

在一個態樣中，本文提供對特異性抗原或一組相關抗原具有特異性

(例如對來自相同蛋白質之抗原具有特異性)之抗原特異性T細胞群體。在一個態樣中，本文提供對一組不相關抗原具有特異性(例如對來自不同蛋白質之抗原具有特異性)之抗原特異性T細胞群體。在某些實施例中，T細胞藉由包含以下步驟之方法生產：(a)自個體分離血液單核細胞，例如PBMC或臍帶血單核細胞；(b)在抗原呈遞細胞(APC)誘導培養基中培養該等血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)以生產第一細胞群體，該抗原呈遞細胞誘導培養基包含介白素4 (IL-4)及可溶性CD40配位體(sCD40L)及/或包含粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)及干擾素 α (IFN- α)；(c)在一或多種抗原存在下培養第一細胞群體，以生產第二細胞群體；及(d)在包含介白素7 (IL-7)、介白素15 (IL-15)及IL-4之T細胞擴增培養基中培養第二細胞群體，以生產第三細胞群體；其中第三細胞群體包含為CD3+且對步驟(c)中所添加之抗原具有特異性之T細胞。在某些態樣中，細胞群體藉由進一步包含如下步驟之方法生產：在包含IL-7及IL-15但不包含IL-4之第二T細胞擴增培養基中培養第三細胞群體，以產生第四細胞群體；其中第四細胞群體包含為CD3+且對步驟(c)中所添加之抗原具有特異性之T細胞。在某些態樣中，細胞群體藉由進一步包含如下步驟之方法生產：自第三細胞群體或第四細胞群體分離為CD3+之T細胞。在某些態樣中，細胞群體藉由步驟(c)在APC誘導培養基中進行之方法生產。

在某些態樣中，第三細胞群體包含另外為CD4+之T細胞。在某些態樣中，第三細胞群體包含另外為CD8+之T細胞。在某些態樣中，第三細胞群體包含另外為CD4+及CD8+之T細胞。

在某些態樣中，第四細胞群體包含另外為CD4+之T細胞。在某些態樣中，第四細胞群體包含另外為CD8+之T細胞。在某些態樣中，第四細

胞群體包含另外為CD4+及CD8+之T細胞。

在某些態樣中，APC誘導培養基包含IL-4及sCD40L。在某些態樣中，APC誘導培養基包含8-12 ng/mL IL-4及0.8-1.2 µg/mL sCD40L。在某些態樣中，APC誘導培養基包含10 ng/mL IL-4及1 µg/mL sCD40L。

在某些態樣中，該一或多種抗原為肽(例如凍乾肽)集合庫或包含在其內。較佳地，該等肽各自衍生自例如表示T細胞針對其待活化之蛋白質的一部分，表示該蛋白質的序列。在某些實施例中，該等肽為10基體、11基體、12基體、13基體、14基體、15基體、16基體、17基體、18基體、19基體或20基體。在某些實施例中，肽集合庫跨越衍生其之特定蛋白質序列而不重疊。在某些其他實施例中，肽集合庫跨越衍生其之特定蛋白質序列而重疊。在特定實施例中，此類肽可連續地重疊1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25個胺基酸。在某些實施例中，蛋白質為腫瘤相關抗原(TAA)。在其他實施例中，蛋白質為腫瘤特異性抗原(TSA)。在特定態樣中，該等肽涵蓋人類HPV16E6、HPV16E7、HPV18E6及/或HPV18E7蛋白質之序列。在某些態樣中，此類肽包含存在於人類HPV16E6、HPV16E7、HPV18E6及/或HPV18E7蛋白質中之每一氨基酸殘基。在某些態樣中，此類肽包含存在於人類HPV16E6、HPV16E7、HPV18E6及/或HPV18E7蛋白質中之胺基酸殘基的一部分。在一特定實施例中，肽涵蓋人類HPV16E6、HPV16E7、HPV18E6及HPV18E7蛋白質之序列。在一特定實施例中，肽涵蓋人類HPV16E6及/或HPV16E7蛋白質之序列且不涵蓋HPV18E6及/或HPV18E7蛋白質。在另一特定實施例中，肽涵蓋人類HPV18E6及/或HPV18E7蛋白質之序列且不涵蓋HPV16E6及/或HPV16E7

蛋白質。在特定態樣中，肽之濃度為1 $\mu\text{g/mL}$ 。在某些態樣中，該一或多種抗原藉由APC由外源性遺傳物質產生。

在某些實施例中，抗原係選自由以下組成之群：B細胞成熟抗原(BCMA)、IL13R α 2、Her2、前列腺幹細胞抗原(PSCA)、 α -胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、癌症抗原-125(CA-125)、CA19-9、鈣網膜蛋白、MUC-1、上皮膜蛋白(EMA)、上皮腫瘤抗原(ETA)、酪胺酸酶、黑素瘤相關抗原(MAGE)、CD19、CD34、CD45、CD99、CD117、染色顆粒素、細胞角蛋白、結蛋白、膠質原纖維酸性蛋白(GFAP)、巨囊性病液狀蛋白(gross cystic disease fluid protein, GCDFP-15)、HMB-45抗原、高分子量黑素瘤相關抗原(HMW-MAA)、蛋白質melan-A(由T淋巴球識別之黑素瘤抗原；MART-1)、myo-D1、肌肉特異性肌動蛋白(MSA)、神經纖毛、神經元特異性烯醇酶(NSE)、胎盤鹼性磷酸酶、突觸素、甲狀腺球蛋白、甲狀腺轉錄因子-1、M2型丙酮酸激酶同功酶之二聚體形式(腫瘤M2-PK)、異常ras蛋白、異常p53蛋白、fuc-GM1、GM2(癌胚抗原-免疫原性-1；OFA-I-1)、GD2(OFA-I-2)、GM3、GD3、 α -輔肌動蛋白-4、Bage-1、BCR-ABL、Bcr-Abl融合蛋白、 β -索煙素、CA 15-3(CA 27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、Casp-8、cdc27、cdk4、cdkn2a、coa-1、dek-can融合蛋白、EBNA、EF2、埃-巴二氏病毒抗原、ETV6-AML1融合蛋白、HLA-A2、HLA-A11、hsp70-2、KIAA0205、Mart2、Mum-1、2及3、neo-PAP、I類肌凝蛋白、OS-9、pml-RAR α 融合蛋白、PTPRK、丙糖磷酸異構酶、Gage 3、4、5、6、7、GnTV、Herv-K-mel、Lage-1、NA-88、NY-Eso-1/Lage-2、SP17、SSX-2、TRP2-Int2、gp100(Pmel 17)、酪胺酸酶、TRP-1、TRP-2、

MAGE-1、MAGE-3、RAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15(58)、RAGE、SCP-1、Hom/Mel-40、PRAME、HER-2/neu、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、人類乳突狀瘤病毒(HPV)抗原E6及E7、TSP-180、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、13-索煙素、Mum-1、p16、TAGE、PSMA、CT7、端粒酶、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733 (EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TAG72、TLP、TPS、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、EGFR ν III (表皮生長因子變體III)、精子蛋白17 (Sp17)、間皮素、PAP (前列腺酸性磷酸酶)、前列腺蛋白、TARP (T細胞受體 γ 替代閱讀框架蛋白質)、Trp-p8、STEAP1 (前列腺1之六次跨膜上皮抗原)、整合素 $\alpha\nu\beta$ 3 (CD61)、泌乳素及Ral-B。

在某些實施例中，抗原為腫瘤相關抗原或腫瘤特異性抗原。在各種特定實施例中，腫瘤相關抗原或腫瘤特異性抗原為(但不限於)Her2、前列腺幹細胞抗原(PSCA)、 α -胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、癌症抗原-125 (CA-125)、CA19-9、鈣網膜蛋白、MUC-1、上皮膜蛋白(EMA)、上皮腫瘤抗原(ETA)、酪胺酸酶、黑素瘤相關抗原(MAGE)、CD19、CD34、CD45、CD99、CD117、染色顆粒素、細胞角蛋白、結蛋白、膠質原纖維酸性蛋白(GFAP)、巨囊性病液狀蛋白(GCDFP-15)、HMB-45抗原、高分子量黑素瘤相關抗原(HMW-MAA)、蛋白質melan-A (由T淋巴球識別之黑素瘤抗原；MART-1)、myo-D1、肌肉特異性肌動蛋白(MSA)、神經纖毛、神經元特異性烯醇酶(NSE)、胎盤鹼性磷酸酶、突觸素、甲狀腺球蛋白

白、甲狀腺轉錄因子-1、M2型丙酮酸激酶同工酶之二聚體形式(腫瘤M2-PK)、異常ras蛋白或異常p53蛋白。

在某些實施例中，TAA或TSA為癌症/睪丸(CT)抗原，例如BAGE、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、HCA661、HOM-TES-85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-ESO-1、NY-SAR-35、OY-TES-1、SPANXB1、SPA17、SSX、SYCP1或TPTE。

在某些其他實施例中，TAA或TSA為碳水化合物或神經節苷脂，例如fuc-GM1、GM2 (癌胚抗原-免疫原性-1；OFA-I-1)；GD2 (OFA-I-2)、GM3、GD3及其類似物。

在某些其他實施例中，TAA或TSA為 α -輔肌動蛋白-4、Bage-1、BCR-ABL、Bcr-Abl融合蛋白、 β -索煙素、CA 125、CA 15-3 (CA 27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、Casp-8、cdc27、cdk4、cdkn2a、CEA、coa-1、dek-can融合蛋白、EBNA、EF2、埃-巴二氏病毒抗原、ETV6-AML1融合蛋白、HLA-A2、HLA-A11、hsp70-2、KIAAO205、Mart2、Mum-1、2及3、neo-PAP、I類肌凝蛋白、OS-9、pml-RAR α 融合蛋白、PTPRK、K-ras、N-ras、丙糖磷酸異構酶、Gage 3、4、5、6、7、GnTV、Herv-K-mel、Lage-1、NA-88、NY-Eso-1/Lage-2、SP17、SSX-2、TRP2-Int2、gp100 (Pmel 17)、酪胺酸酶、TRP-1、TRP-2、MAGE-1、MAGE-3、RAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15(58)、RAGE、SCP-1、Hom/Mel-40、PRAME、p53、H-Ras、HER-2/neu、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、人類乳突狀瘤病毒(HPV)抗原E6及E7、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72-4、CA 19-

9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、13-索脛素、Mum-1、p16、TAGE、PSMA、CT7、端粒酶、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733 (EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TAG72、TLP、TPS、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2 (神經節苷脂G2)、EGFRvIII (表皮生長因子變體III)、精子蛋白17 (Sp17)、間皮素、PAP (前列腺酸性磷酸酶)、前列腺蛋白、TARP (T細胞受體 γ 替代閱讀框架蛋白質)、Trp-p8、STEAP1 (前列腺1之六次跨膜上皮抗原)、異常ras蛋白或異常p53蛋白。在另一特定實施例中，該腫瘤相關抗原或腫瘤特異性抗原為整合素 $\alpha v \beta 3$ (CD61)、泌乳素、K-Ras (V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因)或Ral-B。其他腫瘤相關抗原及腫瘤特異性抗原為熟習此項技術者所已知。

在某些特定實施例中，抗原為不視為TSA或TAA之抗原，但其仍然與腫瘤細胞或由腫瘤導致損傷相關聯。在某些特定實施例中，抗原為新抗原。舉例而言，在某些實施例中，抗原為例如生長因子、細胞介素或介白素，例如與血管生成或血小管生成相關之生長因子、細胞介素或介白素。此類生長因子、細胞介素或介白素可包括例如血管內皮生長因子(VEGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)、血小板衍生長因子(PDGF)、肝細胞生長因子(HGF)、胰島素樣生長因子(IGF)或介白素-8(IL-8)。腫瘤亦可形成腫瘤局部低氧環境。因而，在其他特定實施例中，抗原為低氧相關因子，例如HIF-1 α 、HIF-1 β 、HIF-2 α 、HIF-2 β 、HIF-3 α 或HIF-3 β 。腫瘤亦可對正常組織造成局部損害，導致稱為損害相關性分

子模式分子(DAMP；亦稱為警報素)之分子釋放。因此，在某些其他特定實施例中，抗原為DAMP，例如熱休克蛋白、染色質相關蛋白高遷移率族匣1 (HMGB1)、S100A8 (MRP8，鈣粒蛋白A)、S100A9 (MRP14，鈣粒蛋白B)、血清澱粉狀蛋白A (SAA)，或可為去氧核糖核酸、三磷酸腺苷、尿酸或硫酸肝素。

在某些實施例中，抗原為病毒相關抗原，例如HPV相關抗原。在特定實施例中，抗原為HPV相關抗原。在特定實施例中，抗原為EBV相關抗原。

在某些態樣中，T細胞擴增培養基包含40-60 ng/mL IL-7、7-11 ng/mL IL-15及45-65 ng/mL IL-4。在特定態樣中，T細胞擴增培養基包含50 ng/mL IL-7、9 ng/mL IL-15及55 ng/mL IL-4。

在某些態樣中，第二T細胞擴增培養基包含40-60 ng/mL IL-7及7-11 ng/mL IL-15。在特定態樣中，第二T細胞擴增培養基包含50 ng/mL IL-7及9 ng/mL IL-15。

在某些態樣中，步驟(b)之持續時間為1-3天。在特定態樣中，步驟(b)之持續時間為1天。在某些態樣中，步驟(d)之持續時間為8-16天。在特定態樣中，步驟(d)之持續時間為12天。

在某些態樣中，血液單核細胞(例如PBMC)自全血、白血球層或富集之白血球清除術產物分離。在某些態樣中，血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)以 $4-6 \times 10^6$ 個/平方公分之密度接種於APC誘導培養基中。在特定態樣中，血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)以 5×10^6 個/平方公分之密度接種。在特定態樣中，血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)以大於 5×10^6 個/平方公分之密度接種。

在某些態樣中，抗原特異性CD3+細胞藉由胞內細胞介素染色(ICCS)鑑別。在某些態樣中，培養步驟在G-REX®裝置中進行。在某些態樣中，一或多個培養步驟在T燒瓶中進行。在某些態樣中，一或多個培養步驟在袋子中進行。在特定態樣中，袋子為靜態袋。在某些態樣中，袋子為氣體可滲透的。在某些態樣中，一或多個培養步驟在WAVE™生物反應器中進行。在某些態樣中，一或多個培養步驟在旋轉燒瓶中進行。

在某些態樣中，APC誘導培養基進一步包含具有未甲基化之CpG二核苷酸基元之合成寡核苷酸。在某些態樣中，APC誘導培養基進一步包含GM-CSF及IFN- α 。在某些態樣中，APC誘導培養基包含GM-CSF及IFN- α 。

在一特定實施例中，該T細胞群體包含約70%或更多、在一些實施例中75%、80%、85%、90%、95%、98%、或99%之CD3+細胞。在另一特定實施例中，該T細胞群體包含不少於80%、85%、90%、95%、98%、或99%之CD3+細胞。在另一特定實施例中，該T細胞群體包含70%-75%、75%-80%、80%-85%、85%-90%、90%-95%或95%-99%之間的CD3+細胞。

在某些實施例中，該T細胞群體中之該等CD3+細胞包含另外為CD4+之CD3+細胞。在某些實施例中，該T細胞群體中之該等CD3+細胞包含另外為CD8+之CD3+細胞。在某些實施例中，該T細胞群體中之該等CD3+細胞包含另外為CD4+及CD8+之CD3+細胞。在某些實施例中，該T細胞群體包含CD137+細胞。在某些實施例中，該T細胞群體包含CD154+細胞。在某些實施例中，該T細胞群體包含表現Th1細胞介素之細胞。在某些實施例中，該T細胞群體包含表現IFN- γ 之細胞。在某些實施例中，該T

細胞群體包含表現TNF- α 之細胞。在某些實施例中，該T細胞群體包含表現GM-CSF之細胞。在某些實施例中，該T細胞群體包含表現顆粒酶B之細胞。在某些實施例中，該T細胞群體包含CD3+、CD137+及CD154+細胞。在某些實施例中，該T細胞群體包含CD3+、CD4+、CD137+及CD154+細胞。在某些實施例中，該T細胞群體包含CD3+、CD8+、CD137+及CD154+細胞。在某些實施例中，該T細胞群體包含CD3+、CD8+、CD137+及CD154+細胞。在某些實施例中，該T細胞群體包含CD3+、CD4+、CD8+、CD137+及CD154+細胞。在某些實施例中，該T細胞群體包含CD3+、CD137+、CD154+細胞及表現一或多種Th1細胞介素之細胞。在某些實施例中，該T細胞群體包含CD3+、CD4+、CD137+、CD154+細胞及表現一或多種Th1細胞介素之細胞。在某些實施例中，該T細胞群體包含CD3+、CD8+、CD137+、CD154+細胞及表現一或多種Th1細胞介素之細胞。在某些實施例中，該T細胞群體包含CD3+、CD4+、CD8+、CD137+、CD154+細胞及表現一或多種Th1細胞介素之細胞。

在某些實施例中，T細胞，例如藉由本文所揭示之任何方法生產之T細胞，例如具HPV特異性之T細胞，相較於PBMC，例如產生其之經匹配PBMC，展示增加之一或多種基因之表現，其中該一或多種基因為以下各者中之一或多者：ACSL5、ACSL6、ACTA2、AHRR、ALDH18A1、ALDH6A1、ANAPC11、AP2B1、BAX、BCL6、BRCA1、C5、CCL13、CCL17、CCL18、CCL20、CCL22、CCL4、CCNA1、CCNA2、CCNB1、CCNB2、CCND3、CCNE2、CD40LG、CD80、CD86、CDC20、CDC25A、CDC25A、CDC25C、CDC45、CDC6、CDK1、CDK1、CDK2、CDK2、CDK4、CDK5、CDK6、CDT1、CHEK2、CKLF、COPG2、CXADR、CXCL16、CXCL2、CXCL8、

CXCR5、CXCR5、CYB5A、CYP1A1、CYP1B1、DHFR、E2F1、ESPL1、FADS1、FADS2、FAS、FBXO5、FGFR1、FGFR1、FLOT1、FN1、FOS、FYN、FYN、GADD45B、GALK1、GALK2、GMDS、GMPPA、GSTA4、GSTM4、HLA-DMB、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DRA、IFNGR1、IL12RB1、IL12RB2、IL13、IL1B、IL1B、IL21R、IL2RA、IL2RG、IL4、IL5、IL6ST、IRS2、IRS2、ITGA1、ITGA4、ITGA5、ITGA6、ITGAL、ITGAX、ITGB1、ITGB7、JAM3、JUN、KIF11、KIF23、MAP3K2、MCM2、MCM3、MCM4、MCM5、MGST2、MGST3、MMP25、MYL6B、NQO1、NQO2、NRIP1、PCNA、PHGDH、PIK3C2A、PIK3CA、PLK2、PLK3、PLK4、POLA1、PPM1L、PPP2R3B、PRC1、PRIM1、PRKD3、PSAT1、PSPH、PTTG1、RAC2、RAC3、RAD50、RAD51、RARA、RBBP8、RRAS、SDC4、SELPLG、SHMT1、SHMT2、SLC27A2、SMC2、STAT1、TFDP1、TGFB1、TGFB2、TGM2、TOP2A、TSTA3、UGDH、XCL1、XCL2、ZEB1及/或ZNF420。在某些實施例中，增加之表現為5倍、10倍、15倍、20-倍、25-倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更大。在某些其他實施例中，T細胞，例如藉由本文所揭示之任何方法生產之T細胞，例如具HPV特異性之T細胞，相較於已另外藉由本文所描述之方法生產的未經脈衝之細胞(亦即，沒有暴露於PepMix之T細胞)，展示增加之一或多種基因之表現，其中該一或多種基因為以下各者中之一或多者：CCL18 (趨化細胞素(C-C基元)配位體18)；CH13L1 (類殼質酶-3蛋白質)；FN1 (纖維結合蛋白1)；LYZ (溶菌酶)；RCHY1 (環指及CHY鋅指1)；及PALLD (帕拉丁(Palladin)，細胞骨

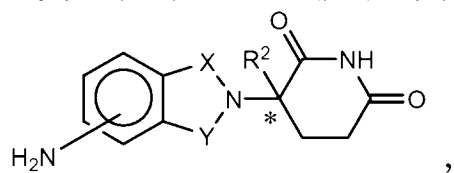
架相關蛋白質)。此類T細胞可用於例如本文所描述之任何治療方法中。

5.4 包含T細胞之組合物

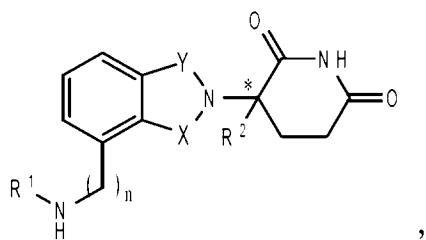
在一些實施例中，本文提供一種包含使用本文所描述之方法生產之T細胞群體的組合物，例如一種醫藥組合物。在一特定實施例中，在組合物中該T細胞群體包含至少50%之細胞。在另一特定實施例中，在組合物中，該T細胞群體，例如CD3+細胞，包含至少80%、85%、90%、95%、98%或99%之細胞。在某些實施例中，在該T細胞群體中，不超過0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%或45%之細胞為CD3+細胞。在某些實施例中，該等CD3+細胞為CD4+及/或CD8+。在某些實施例中，該等CD3+細胞為CD137+。在某些實施例中，該等CD3+細胞為CD154+。在某些實施例中，該等CD3+細胞表現Th1細胞介素。在某些實施例中，該等CD3+細胞表現IFN- γ 。在某些實施例中，CD3+細胞表現TNF- α 。在某些實施例中，CD3+細胞表現GM-CSF。在某些實施例中，CD3+細胞表現顆粒酶B。在某些實施例中，該等CD3+細胞為CD137+及CD154+。在某些實施例中，該等CD3+細胞為CD4+、CD137+及CD154+。在某些實施例中，該等CD3+細胞為CD8+、CD137+及CD154+。在某些實施例中，該等CD3+細胞為CD4+、CD8+、CD137+及CD154+。在某些實施例中，該等CD3+細胞為CD137+、CD154+，且表現一或多種Th1細胞介素。在某些實施例中，該等CD3+細胞為CD4+、CD137+、CD154+，且表現一或多種Th1細胞介素。在某些實施例中，該等CD3+細胞為CD8+、CD137+、CD154+，且表現一或多種Th1細胞介素。在某些實施例中，該等CD3+細胞為CD4+、CD8+、CD137+、

CD154+，且表現一或多種Th1細胞介素。

在一特定實施例中，該組合物中之該等T細胞來自與意欲再引入例如使用T細胞之治療之個體相同的個體(亦即，T細胞對吾人所需之接受者而言為自體的)。在另一特定實施例中，該組合物中之該等T細胞來自與意欲再引入例如使用T細胞之治療之個體不同的個體(亦即T細胞對吾人所需之接受者而言不為自體的)。在另一特定實施例中，該組合物另外包含免疫調節化合物或沙立度胺(thalidomide)。在某些實施例中，免疫調節化合物為下文所描述之化合物。參見例如美國專利第7,498,171號，其揭示內容特此以全文引用之方式併入。在某些實施例中，免疫調節化合物為經胺基取代之異吡啶啉。在一個實施例中，免疫調節化合物為3-(4-胺基-1-側氧基-1,3-二氫異吡啶-2-基)-哌啶-2,6-二酮；3-(4'胺基異吡啶啉-1'-酮)-1-哌啶-2,6-二酮；4-(胺基)-2-(2,6-二側氧基(3-哌啶基))-異吡啶啉-1,3-二酮；或4-胺基-2-(2,6-二側氧基哌啶-3-基)異吡啶啉-1,3-二酮。在另一實施例中，免疫調節化合物為泊利度胺(pomalidomide)或來那度胺(lenalidomide)。在另一實施例中，該免疫調節化合物為具有以下結構之化合物：



其中X及Y中之一者為C=O，且X與Y中之另一者為C=O或CH₂，且R²為氫或低碳烷基，或其醫藥學上可接受之鹽、水合物、溶劑合物、籠形化合物、對映異構體、非對映異構體、外消旋體或立體異構體之混合物。在另一實施例中，該免疫調節化合物為具有以下結構之化合物：



其中X及Y中之一者為C=O且另一者為CH₂或C=O；

R¹為H、(C₁-C₈)烷基、(C₃-C₇)環烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₂-C₈)炔基、
 苯甲基、芳基、(C₀-C₄)烷基-(C₁-C₆)雜環烷基、(C₀-C₄)烷基-(C₂-C₅)雜芳
 基、C(O)R³、C(S)R³、C(O)OR⁴、(C₁-C₈)烷基-N(R⁶)₂、(C₁-C₈)烷基-
 OR⁵、(C₁-C₈)烷基-C(O)OR⁵、C(O)NHR³、C(S)NHR³、C(O)NR³R^{3'}、
 C(S)NR³R^{3'}或(C₁-C₈)烷基-O(CO)R⁵；

R²為H、F、苯甲基、(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烯基或(C₂-C₈)炔基；

R³及R^{3'}獨立地為(C₁-C₈)烷基、(C₃-C₇)環烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₂-
 C₈)炔基、苯甲基、芳基、(C₀-C₄)烷基-(C₁-C₆)雜環烷基、(C₀-C₄)烷基-
 (C₂-C₅)雜芳基、(C₀-C₈)烷基-N(R⁶)₂、(C₁-C₈)烷基-OR⁵、(C₁-C₈)烷基-
 C(O)OR⁵、(C₁-C₈)烷基-O(CO)R⁵或C(O)OR⁵；

R⁴為(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₂-C₈)炔基、(C₁-C₄)烷基-OR⁵、
 苯甲基、芳基、(C₀-C₄)烷基-(C₁-C₆)雜環烷基或(C₀-C₄)烷基-(C₂-C₅)雜芳
 基；

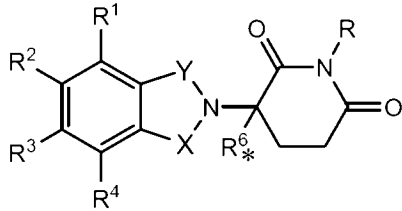
R⁵為(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₂-C₈)炔基、苯甲基、芳基或(C₂-
 C₅)雜芳基；

R⁶在每次出現時獨立地為H、(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₂-C₈)炔
 基、苯甲基、芳基、(C₂-C₅)雜芳基或(C₀-C₈)烷基-C(O)O-R⁵，或R⁶基團
 可連接而形成雜環烷基；

n為0或1；且

*表示對掌性碳中心；

或其醫藥學上可接受之鹽、水合物、溶劑合物、籠形化合物、對映異構體、非對映異構體、外消旋體或立體異構體之混合物。在另一實施例中，該免疫調節化合物為具有以下結構之化合物：



其中：

X及Y中之一者為C=O且另一者為CH₂或C=O；

R為H或CH₂OCOR'；

(i) R¹、R²、R³或R⁴中之每一者各自獨立地為為鹵基、1至4個碳原子之烷基或1至4個碳原子之烷氧基，或(ii) R¹、R²、R³或R⁴中之一者為硝基或-NHR⁵且R¹、R²、R³或R⁴中之其餘者為氫；

R⁵為氫或1至8個碳之烷基；

R⁶為氫、1至8個碳原子之烷基、苯并、氯或氟；

R'為R⁷-CHR¹⁰-N(R⁸R⁹)；

R⁷為間伸苯基或對伸苯基或-(C_nH_{2n})-，其中n之值為0至4；

R⁸及R⁹中之每一者各自獨立地為氫或1至8個碳原子之烷基，或R⁸及R⁹一起為四亞甲基、五亞甲基、六亞甲基或-CH₂CH₂X₁CH₂CH₂-，其中X₁為-O-、-S-或-NH-；

R¹⁰為氫、至8個碳原子之烷基、或苯基；且

*表示對掌性碳中心；

或其醫藥學上可接受之鹽、水合物、溶劑合物、籠形化合物、對映異構體、非對映異構體、外消旋體或立體異構體之混合物。

在另一特定實施例中，組合物另外包含一或多種抗癌化合物，例如下文所描述之一或多種抗癌化合物。在另一特定實施例中，組合物另外包含免疫調節藥物或表觀遺傳修飾劑。在另一特定實施例中，組合物包含免疫檢查點抑制劑。在更特定實施例中，免疫檢查點抑制劑選自由抗CTLA-4抗體、抗PD1抗體及抗PD-L1抗體組成之群。

在某些實施例中，抗原特異性T細胞係於醫藥學上可接受之溶液中調配。在較佳實施例中，醫藥學上可接受之溶液適用於遞送活細胞。在特定實施例中，醫藥學上可接受之溶液為例如生理食鹽水溶液(諸如林格氏溶液(Ringer's solution)、明膠、碳水化合物(例如乳糖、直鏈澱粉、澱粉，等)、脂肪酸酯、羥基甲基纖維素或聚乙烯基吡咯啉。在更特定實施例中，醫藥學上可接受之溶液在添加細胞之前滅菌。在其他更特定實施例中，醫藥學上可接受之溶液可與輔助劑混合，該等輔助劑諸如潤滑劑、防腐劑、穩定劑、乳化劑、影響滲透壓之鹽、緩衝劑及著色劑。適用於調配細胞之醫藥載劑在此項技術中已知且描述於例如WO 96/05309中。在特定實施例中，醫藥學上可接受之溶液包含聚葡萄糖-40、人類血清白蛋白、血漿Lyte A、氯化鈉及二甲亞砜中之一或多者。在某些實施例中，抗原特異性T細胞係於具有低溫保護劑之溶液中調配。在特定實施例中，低溫保護劑為二甲亞砜(DMSO)。

在某些實施例中，在一或多個輸注袋中提供藉由本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞。

5.5 抗原特異性T細胞之用途

在某些實施例中，本文提供治療癌症或病毒感染之方法，其包含向有需要患者投與藉由本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞群體，例

如來自分離之血液單核細胞，例如PBMC或臍帶血單核細胞。在某些實施例中，分離之血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)為患者自體的。在某些實施例中，分離之血液單核細胞(例如PBMC或臍帶血單核細胞)不為患者自體的。

使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞可用於治療患有癌症之個體之方法中，該等個體例如具有實體腫瘤細胞及/或血液癌細胞之個體，或具有病毒感染之個人。使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞亦可用於治療處於罹患癌症風險下之個體或防止癌症發展的方法中。

5.5.1 治療患有癌症之個體

在一個實施例中，本文提供一種治療患有癌症(例如血液癌或實體腫瘤)之個體之方法，其包含向該個體投與治療有效量之使用本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞。在一個實施例中，本文提供一種治療處於罹患癌症(例如血液癌或實體腫瘤)風險下之個體之方法，其包含向該個體投與治療有效量之使用本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞。在特定實施例中，T細胞對由癌症表現之抗原具有特異性。在更特定實施例中，T細胞對上文部分5.3中所揭示之腫瘤相關抗原或腫瘤特異性抗原中之一或多者具有特異性。在某些實施例中，T細胞為藉由本文所描述之任何方法生產之抗原特異性T細胞。在某些實施例中，個體缺乏T細胞，例如缺乏對個體癌症具有活性之T細胞。在某些實施例中，個體之T細胞太少。在某些實施例中，該個體具有具受抑制活性之T細胞。如本文所用，「有效量」為例如可偵測地改善個體所患癌症之一或多種症狀進展減輕或消除的量。

在特定態樣中，個體患有原發性導管癌、白血病、急性T細胞白血

病、慢性骨髓淋巴瘤、急性骨髓性白血病、多發性骨髓瘤、慢性骨髓性白血病、肺癌、結腸腺癌、組織細胞淋巴瘤、多發性骨髓瘤、視網膜母細胞瘤或結腸直腸癌。

在某些實施例中，本文提供治療患有HPV陽性(HPV+)癌症之個體之方法。在特定實施例中，HPV+癌症為頭頸癌。在更特定實施例中，HPV+癌症為頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)。在特定實施例中，HPV+癌症為口咽癌。在某些態樣中，HPV+癌症為陰莖癌。在某些態樣中，HPV+癌症為宮頸癌。在某些態樣中，HPV+癌症為肛門癌。在某些態樣中，HPV+癌症為外陰癌。在某些態樣中，HPV+癌症為陰道癌。在某些態樣中，HPV+癌症為肺癌。在特定實施例中，HPV+癌症為HPV-16+。在特定實施例中，HPV+癌症為HPV-18+。在特定實施例中，HPV+癌症為HPV-16+及HPV-18+。在某些實施例中，HPV+癌症為轉移性的。在某些實施例中，HPV+癌症為復發性的。在某些實施例中，HPV+癌症為轉移性及復發性的。在某些實施例中，本文提供治療患有如藉由免疫組織化學所確定之HPV+癌症之個體的方法。在某些實施例中，本文提供治療患有如藉由聚合酶鏈反應所確定之HPV+癌症之個體的方法。在某些實施例中，本文提供治療患有如藉由RNA螢光原位雜交所確定之HPV+癌症之個體的方法。在某些實施例中，本文提供治療患有HPV+癌症之先前已用西妥昔單抗(cetuximab)治療之個體的方法。在某些實施例中，本文提供治療患有HPV+癌症之先前已用鉑基兩藥(platinum-based doublet)治療之個體的方法。在某些實施例中，本文提供治療患有HPV+癌症之先前已用西妥昔單抗及鉑基兩藥治療之個體的方法。在某些實施例中，鉑基兩藥為順鉑(cisplatin)/5-FU。在某些實施例中，鉑基兩藥為卡鉑(carboplatin)/5-

FU。在某些實施例中，本文提供治療患有HPV+癌症之先前已用PD-1抑制劑治療之個體的方法。在某些實施例中，PD-1抑制劑為派立珠單抗(pembrolizumab，KEYTRUDA®；Merck)。在某些實施例中，PD-1抑制劑為尼沃單抗(nivolumab，OPDIVO®；Bristol-Myers Squibb)。在某些實施例中，本文提供治療患有HPV+癌症之先前已用PD-L1抑制劑治療之個體的方法。在某些實施例中，PD-L1抑制劑為德瓦魯單抗(durvalumab，MedImmune)。

在某些態樣中，該方法進一步包含向上文該等個體中之任一者投與免疫調節藥物或表觀遺傳修飾劑。在特定態樣中，該方法進一步包含向該個體投與免疫檢查點抑制劑。在更特定態樣中，免疫檢查點抑制劑選自由抗CTLA-4抗體、抗PD1抗體及抗PD-L1抗體組成之群。在某些實施例中，PD-1抑制劑為派立珠單抗(KEYTRUDA®；Merck)。在某些實施例中，PD-1抑制劑為尼沃單抗(OPDIVO®；Bristol-Myers Squibb)。在某些其他實施例中，PD-L1抑制劑為德瓦魯單抗(MedImmune)。在另一特定實施例中，抗CTLA4抗體為伊派利單抗(ipilimumab，YERVOY®；Bristol-Meyers)。

在特定實施例中，向個體投與分離之T細胞群體或其醫藥組合物係藉由注射、輸注、靜脈內(IV)投與、股骨內投與或瘤內投與。在特定實施例中，向個體投與分離之T細胞群體或其醫藥組合物係用裝置、基質或支架進行。

5.5.2 使用T細胞及其他抗癌劑治療癌症

利用使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞治療患有癌症的個體可為包括一或多種其他抗癌劑之抗癌療法的一部分。另外或替代地，

利用使用本文所描述之方法生產之T細胞治療患有癌症之個體可用以補充包括一或多種其他抗癌劑之抗癌療法。此類抗癌劑在此項技術中為熟知的且包括消炎劑、免疫調節劑、細胞毒性劑、癌症疫苗、化學治療劑、HDAC抑制劑及siRNA。除使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞以外，可向患有癌症之個體(例如具有腫瘤細胞之個體)投與之特定抗癌劑包括(但不限於)：阿西維辛(acivicin)；阿克拉黴素(aclarubicin)；鹽酸阿考達唑(acodazole hydrochloride)；阿克羅寧(acronine)；阿多來新(adozelesin)；阿德力黴素(adriamycin)；阿德希爾(adrucil)；阿地白介素(aldesleukin)；六甲蜜胺(altretamine)；安波黴素(ambomycin)；乙酸阿美蔥醌(ametantrene acetate)；安吡啶(amsacrine)；阿那曲唑(anastrozole)；安黴黴素(anthramycin)；天冬醯胺酶(asparaginase)(例如來自菊歐文氏菌(*Erwinia chrysan*)；歐文菌天冬醯胺酶(Erwinaze))；曲林菌素(asperlin)；阿瓦斯汀(avastin (貝伐單抗(bevacizumab)))；阿紫胞苷(azacitidine)；阿紫替派(azetepa)；阿佐黴素(azotomycin)；巴馬司他(batimastat)；苯佐替派(benzodepa)；比卡魯胺(bicalutamide)；鹽酸比山群(bisantrene hydrochloride)；二甲磺酸雙奈法德(bisnafide dimesylate)；比折來新(bizelesin)；硫酸博萊黴素(bleomycin sulfate)；布喹那鈉(brequinar sodium)；溴匹立明(bropirimine)；白消安(busulfan)；放線菌素C(cactinomycin)；卡魯甞酮(calusterone)；卡醋胺(caracemide)；卡貝替姆(carbetimer)；卡鉑；卡莫司汀(carmustine)；鹽酸卡柔比星(carubicin hydrochloride)；卡折來新(carzelesin)；西地芬戈(cedefingol)；塞內昔布(celecoxib，COX-2抑制劑)；柔紅黴素(Cerubidine)；苯丁酸氮芥(chlorambucil)；西羅黴素(cirolemycin)；順

鉑；克拉屈濱(cladribine)；甲磺酸克立那托(crisnatol mesylate)；環磷醯胺(cyclophosphamide)；阿糖胞苷(cytarabine)；達卡巴嗪(dacarbazine)；放線菌素 D (dactinomycin)；鹽酸道諾黴素(daunorubicin hydrochloride)；地西他濱(decitabine)；右奧馬鉑(dexormaplatin)；地紮胍寧(dezaguanine)；甲磺酸地紮胍寧(dezaguanine mesylate)；地吡醌(diaziquone)；多西他賽(docetaxel)；小紅莓(doxorubicin)；鹽酸小紅莓(doxorubicin hydrochloride)；曲洛昔芬(droloxifene)；檸檬酸曲洛昔芬(droloxifene citrate)；丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)；達佐黴素(duazomycin)；依達曲沙(edatrexate)；鹽酸依氟烏胺酸(eflomithine hydrochloride)；依沙蘆星(elsamitrucin)；愛施巴(Elspar)；恩洛鉑(enloplatin)；恩普胺酯(enpromate)；依匹哌啉(epipropidine)；鹽酸表柔比星(epirubicin hydrochloride)；厄布洛唑(erbulozole)；鹽酸依索比星(esorubicin hydrochloride)；雌氮芥(estramustine)；雌氮芥磷酸鈉(estramustine phosphate sodium)；依他噠唑(etanidazole)；依託泊苷(etoposide)；磷酸依託泊苷(etoposide phosphate)；凡畢複(Etopophos)；埃托寧(etoprine)；鹽酸法屈唑(fadrozole hydrochloride)；法紮拉濱(fazarabine)；非瑞替尼(fenretinide)；氟尿苷(floxuridine)；磷酸氟達拉賓(fludarabine phosphate)；氟尿嘧啶(flourouracil)；氟西他濱(flurocitabine)；磷喹酮(fosquidone)；福司曲星鈉(fostriecin sodium)；吉西他濱(gemcitabine)；鹽酸吉西他濱(gemcitabine hydrochloride)；羥基脲(hydroxyurea)；艾達米星(Idamycin)；鹽酸艾達黴素(idarubicin hydrochloride)；異環磷醯胺(ifosfamide)；伊莫福新(ilmofosine)；異丙鉑(iproplatin)；伊立替康(irinotecan)；鹽酸伊立替康(irinotecan

hydrochloride)；乙酸蘭瑞肽(lanreotide acetate)；來曲唑(letrozole)；乙酸亮丙立德(leuprolide acetate)；鹽酸利阿唑(liarozole hydrochloride)；洛美曲索鈉(lometrexol sodium)；洛莫司汀(lomustine)；鹽酸洛索蔥醌(losoxantrone hydrochloride)；馬索羅酚(masoprocol)；美登素(maytansine)；鹽酸氮芥(mechlorethamine hydrochloride)；乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)；乙酸甲烯雌醇(melengestrol acetate)；美法侖(melphalan)；美諾立爾(menogaril)；巯基嘌呤(mercaptopurine)；甲胺喋呤(methotrexate)；甲胺喋呤鈉(methotrexate sodium)；氯苯胺啉(metoprine)；美妥替哌(meturedopa)；米丁度胺(mitindomide)；米托卡西(mitocarcin)；米托羅米(mitocromin)；米托潔林(mitogillin)；米托馬星(mitomalcin)；絲裂黴素(mitomycin)；米托司培(mitosper)；米托坦(mitotane)；鹽酸米托蔥醌(mitoxantrone hydrochloride)；黴酚酸(mycophenolic acid)；諾考達唑(nocodazole)；諾加黴素(nogalamycin)；奧馬鉑(ormaplatin)；奧昔舒侖(oxisuran)；太平洋紫杉醇(paclitaxel)；培門冬酶(pegaspargase)；培利黴素(peliomycin)；奈莫司汀(pentamustine)；硫酸培洛黴素(peplomycin sulfate)；培磷醯胺(perfosfamide)；哌泊溴烷(pipobroman)；哌泊舒凡(piposulfan)；鹽酸吡羅蔥醌(piroxantrone hydrochloride)；普卡黴素(plicamycin)；普洛美坦(plomestane)；卟吩姆鈉(porfimer sodium)；泊非羅黴素(porfiromycin)；潑尼氮芥(prednimustine)；鹽酸丙卡巴肼(procarbazine hydrochloride)；普羅金(Proleukin)；嘌呤托(Purinethol)；嘌呤黴素(puromycin)；鹽酸嘌呤黴素(puromycin hydrochloride)；吡唑呋喃菌素(pyrazofurin)；赫瑪瑞斯(Rheumatrex)；利波腺昔(riboprine)；沙芬戈

(safingol)；鹽酸沙芬戈(safingol hydrochloride)；司莫司汀(semustine)；辛曲秦(simtrazene)；司泊索非鈉(sparfosate sodium)；司帕黴素(sparsomycin)；鹽酸螺旋鍺(spirogermanium hydrochloride)；螺莫司汀(spiromustine)；螺鉑(spiroplatin)；鏈黑黴素(streptonigrin)；鏈脲菌素(streptozocin)；磺氯苯脲(sulofenur)；Tabloid；他利黴素(talisomycin)；替康蘭鈉(tecogalan sodium)；克癌易(taxotere)；喃氟啶(tegafur)；鹽酸替洛蔥醌(teloxantrone hydrochloride)；替莫泊芬(temoporfin)；替尼泊甙(teniposide)；替羅昔隆(teroxirone)；辜內酯(testolactone)；硫米噁吟(thiamiprine)；硫鳥噁吟(thioguanine)；噻替派(thiotepa)；噻唑呔林(tiazofurin)；替拉紮明(tirapazamine)；托泊沙(Toposar)；檸檬酸托瑞米芬(toremifene citrate)；乙酸曲托龍(trestolone acetate)；曲西樂(Trexall)；磷酸曲西立濱(triciribine phosphate)；三甲曲沙(trimetrexate)；葡糖醛酸三甲曲沙(trimetrexate glucuronate)；曲普瑞林(triptorelin)；鹽酸妥布氯唑(tubulozole hydrochloride)；尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；烏瑞替派(uredepa)；伐普肽(vapreotide)；維替泊芬(verteporfin)；硫酸長春花鹼(vinblastine sulfate)；硫酸長春新鹼(vincristine sulfate)；長春地辛(vindesine)；硫酸長春地辛(vindesine sulfate)；硫酸長春匹定(vinepidine sulfate)；硫酸長春甘酯(vinglycinate sulfate)；硫酸長春羅新(vinleurosine sulfate)；酒石酸長春瑞賓(vinorelbine tartrate)；硫酸長春羅定(vinrosidine sulfate)；硫酸長春利定(vinzolidine sulfate)；伏羅唑(vorozole)；折尼鉑(zeniplatin)；淨司他丁(zinostatin)；及鹽酸左柔比星(zorubicin hydrochloride)。

其他抗癌藥物包括(但不限於)：20-表-1,25二羥維生素D3；5-氮胞苷

(5-azacytidine) ; 5- 乙 炔 尿 嘧 啶 (5-ethynyluracil) ; 阿 比 特 龍 (abiraterone) ; 阿 克 拉 黴 素 (aclarubicin) ; 醯 基 富 烯 (acylfulvene) ; 腺 環 戊 醇 (adecypenol) ; 阿 多 來 新 (adozelesin) ; 阿 地 白 介 素 ; ALL-TK 拮 抗 劑 ; 六 甲 蜜 胺 ; 胺 莫 司 汀 (ambamustine) ; 艾 美 多 (amidox) ; 阿 米 福 汀 (amifostine) ; 胺 基 乙 醯 丙 酸 (aminolevulinic acid) ; 胺 柔 比 星 (amrubicin) ; 安 吡 啶 (amsacrine) ; 阿 那 格 雷 (anagrelide) ; 阿 那 曲 唑 (anastrozole) ; 穿 心 蓮 內 酯 (andrographolide) ; 血 管 生 成 抑 制 劑 ; 拮 抗 劑 D ; 拮 抗 劑 G ; 安 他 利 (antarelix) ; 抗 背 部 形 態 發 生 蛋 白 -1 (anti-dorsalizing morphogenetic protein-1) ; 抗 雄 激 素 (antiandrogen) ; 前 列 腺 癌 ; 抗 雌 激 素 (antiestrogen) ; 抗 新 普 拉 通 (antineoplaston) ; 反 義 寡 核 苷 酸 ; 甘 胺 酸 阿 非 迪 黴 素 (aphidicolin glycinate) ; 細 胞 凋 亡 基 因 調 節 劑 ; 細 胞 凋 亡 調 節 因 子 ; 脫 嘧 呤 核 酸 (apurinic acid) ; ara-CDP-DL-PTBA ; 精 胺 酸 脫 胺 酶 ; 奧 沙 那 寧 (asulacrine) ; 阿 他 美 坦 (atamestane) ; 阿 莫 司 汀 (atrimustine) ; 阿 新 司 坦 汀 1 (axinastatin 1) ; 阿 新 司 坦 汀 2 ; 阿 新 司 坦 汀 3 ; 阿 紮 司 瓊 (azasetron) ; 阿 紮 托 新 (azatoxin) ; 重 氮 酪 胺 酸 (azatyrosine) ; 巴 卡 丁 III 衍 生 物 (baccatin III derivatives) ; 巴 拉 諾 (balanol) ; 巴 馬 司 他 (batimastat) ; BCR/ABL 拮 抗 劑 ; 苯 并 二 氫 卟 吩 (benzochlorins) ; 苯 甲 醯 基 星 形 孢 菌 素 (benzoylstaurosporine) ; β 內 醯 胺 衍 生 物 ; β -阿 立 辛 (beta-alethine) ; β 克 拉 黴 素 B (betaclamycin B) ; 樺 木 酸 (betulinic acid) ; bFGF 抑 制 劑 ; 比 卡 魯 胺 (bicalutamide) ; 比 山 群 (bisantrene) ; 雙 氮 丙 啶 基 精 胺 (bisaziridinylspermine) ; 雙 奈 法 德 ; 雙 特 拉 汀 A (bistratene A) ; 比 折 來 新 (bizelesin) ; 比 銳 來 特 (breflate) ; 溴 匹 立 明 (bropirimine) ; 布 度 鈦 (budotitane) ; 丁 硫 胺 酸 磺 醯 亞 胺 (buthionine

sulfoximine)；鈣泊三醇(calcipotriol)；鈣磷酸蛋白C (calphostin C)；坎普土沙(camptosar，也稱作坎普土(Campto)；伊立替康)喜樹鹼(camptothecin)衍生物；卡培他濱(capecitabine)；甲醯胺-胺基-三唑(carboxamide-amino-triazole)；羧胺三唑(carboxyamidotriazole)；CaRest M3；CARN 700；軟骨衍生抑制劑；卡折來新(carzelesin)；酪蛋白激酶抑制劑(ICOS)；栗樹精胺(castanospermine)；CC-122；CC-486；殺菌肽B (cecropin B)；西曲瑞克(cetorelix)；克羅林(chlorlins)；氯喹啉磺醯胺(chloroquinoline sulfonamide)；西卡前列素(cicaprost)；順卟啉(cis-porphyrin)；克拉屈濱；克羅米芬類似物；克黴唑(clotrimazole)；克立黴素A (collismycin A)；克立黴素B；康柏斯達汀A4 (combretastatin A4)；康柏斯達汀類似物；康納京尼(conagenin)；卡那貝西汀816 (crambescidin 816)；克立那托(crisnatol)；克瑞托欣8 (cryptophycin 8)；克瑞托欣A衍生物；卡拉新A (curacin A)；環戊蔥醌(cyclopentantraquinones)；環普蘭姆(cycloplam)；西匹黴素(cypemycin)；阿糖胞苷十八烷基磷酸鹽(cytarabine octofosphate)；溶胞因子；昔托斯他汀(cytostatin)；達昔單抗(dacliximab)；地西他濱；去氫登第敏B (dehydrodidenmin B)；德舍瑞林(deslorelin)；地塞米松(dexamethasone)；右異環磷醯胺(dexifosfamide)；右雷佐生(dexrazoxane)；右維拉帕米(dexverapamil)；地吡醌；迪德尼B (didemnin B)；地多西(didox)；二乙基降精胺(diethylnorspermine)；二氫-5-氮胞苷；9-二氫紫杉醇(dihydrotaxol, 9-)；二噁黴素(dioxamycin)；二苯基螺莫司汀(diphenyl spiromustine)；多烯紫杉醇(docetaxel)；多可沙諾(docosanol)；多拉司瓊(dolasetron)；去氧氟尿苷(doxifluridine)；小

紅莓；曲洛昔芬；屈大麻酚(dronabinol)；倍癌黴素SA (duocarmycin SA)；依布硒啉(ebselen)；依考莫司汀(ecomustine)；依地福新(edelfosine)；依決洛單抗(edrecolomab)；依氟烏胺酸(eflornithine)；欖香烯(elemene)；乙嘧替氟(emitofur)；表柔比星；愛普列特(epristeride)；雌氫芥類似物；雌激素促效劑；雌激素拮抗劑；依他噠唑(etanidazole)；磷酸依託泊苷；依西美坦(exemestane)；法屈唑；法紮拉濱；非瑞替尼；非格司亭(filgrastim)；非那雄安(finasteride)；夫拉平度(flavopiridol)；氟卓斯汀(flezelastine)；氟斯特酮(flusterone)；氟達拉賓(fludarabine)（例如氟達拉(Fludara)）；鹽酸氟道諾欣(fluorodaunorubicin hydrochloride)；福酚美克(forfenimex)；福美司坦(formestane)；福司曲星(fostriecin)；福莫司汀(fotemustine)；德卞啉釷(gadolinium texaphyrin)；硝酸鎂；加洛他濱(galocitabine)；加尼瑞克(ganirelix)；明膠酶抑制劑；吉西他濱(gemcitabine)；麩胱甘肽抑制劑；海普法姆(hepsulfam)；海瑞古林(heregulin)；六亞甲基雙乙醯胺(hexamethylene bisacetamide)；金絲桃毒(hypericin)；伊班膦酸(ibandronic acid)；艾達黴素(idarubicin)；艾多昔芬(idoxifene)；伊決孟酮(idramantone)；伊莫福新(ilmofosine)；伊洛馬司他(ilomastat)；伊馬替尼(imatinib)（例如GLEEVEC®）；咪喹莫特(imiquimod)；免疫刺激肽；胰島素樣生長因子-1受體抑制劑；干擾素促效劑；干擾素；介白素；碘苜瓜(iobenguane)；碘多柔比星(iododoxorubicin)；4-甘薯醇(ipomeanol, 4-)；伊羅普拉(iroplact)；伊索拉定(irsogladine)；異苯胍唑(isobengazole)；異海利德林B(isohomohalicondrin B)；伊他司瓊(itasetron)；伽斯利德(jasplakinolide)；卡哈利德F(kahalalide F)；片螺

素-N三乙酸鹽(lamellarin-N triacetate)；蘭瑞肽(lanreotide)；雷那黴素(leinamycin)；來格司亭(lenograstim)；硫酸蘑菇多醣(lentinan sulfate)；立托斯坦汀(leptolstatin)；來曲唑(letrozole)；白血病抑制因子；白細胞 α 干擾素；亮丙立德(leuprolide) + 雌激素+孕酮；亮丙瑞林(leuprorelin)；左旋咪唑(levamisole)；利阿唑(liarozole)；直鏈多元胺類似物；親脂性雙醣肽；親脂性鉑化合物；立索克林醯胺7 (lissoclinamide 7)；洛鉑(lobaplatin)；蚯引磷脂(lombricine)；洛美曲索(lometrexol)；氯尼達明(lonidamine)；洛索蔥醌(losoxantrone)；洛索立賓(loxoribine)；勒托替康(lurtotecan)；德卜啞鎳(lutetium texaphyrin)；里斯福林(lysofylline)；溶解肽；美坦新(maitansine)；麥洛坦汀A (mannostatin A)；馬立馬司他(marimastat)；馬索羅酚(masoprocol)；馬斯平(maspin)；基質溶素抑制劑；基質金屬蛋白酶抑制劑；美諾立爾(menogaril)；麥爾巴隆(merbarone)；美替瑞林(meterelin)；蛋胺酶(methioninase)；甲氧氯普胺(metoclopramide)；MIF抑制劑；米非司酮(mifepristone)；米替福新(miltefosine)；米立司亭(mirimostim)；丙脒脞(mitoguazone)；二溴衛矛醇(mitolactol)；絲裂黴素類似物(mitomycin analogue)；米托萘胺(mitonafide)；米托毒素纖維母細胞生長因子-沙泊寧(mitotoxin fibroblast growth factor-saporin)；米托蔥醌(mitoxantrone)；莫法羅汀(mofarotene)；莫拉司亭(molgramostim)；抗EGFR抗體(例如 Erbitux (西妥昔單抗(cetuximab)))；抗CD19抗體；抗CD20抗體(例如利妥昔單抗(rituximab))；抗雙唾液酸神經節苷脂(GD2)抗體(例如單株抗體3F8或ch14>18)；抗ErbB2抗體(例如赫賽汀(herceptin))；人類絨毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin)；單磷醯基脂質A+分支桿菌細胞壁

sk ; 莫哌達醇(mopidamol) ; 氮芥抗癌劑 ; 印度洋海綿B (mycaperoxide B) ; 分支桿菌細胞壁提取物(mycobacterial cell wall extract) ; 邁瑞酮(myriaporone) ; N-乙醯地那林(N-acetyldinaline) ; N取代之苯甲醯胺 ; 那法瑞林(nafarelin) ; 納格瑞替(nagrestip) ; 納洛酮+戊唑星(naloxone+pentazocine) ; 納帕維(napavin) ; 奈帕特林(naphterpin) ; 那托司亭(nartograstim) ; 奈達鉑(nedaplatin) ; 奈莫柔比星(nemorubicin) ; 奈立膦酸(neridronic acid) ; 尼魯胺(nilutamide) ; 尼撒黴素(nisamycin) ; 氧化氮調節劑(nitric oxide modulators) ; 氮氧化物抗氧化劑(nitroxide antioxidant) ; 紐崔林(nitrullyn) ; 奧利默森(oblimersen)(GENASENSE®) ; O6-苯甲基鳥嘌呤(O6-benzylguanine) ; 奧曲肽(octreotide) ; 奧克恩(okicenone) ; 寡核苷酸 ; 奧那司酮(onapristone) ; 昂丹司瓊(ondansetron) ; 昂丹司瓊 ; 奧拉新(oracin) ; 口服細胞激素誘導劑 ; 奧馬鉑(ormaplatin) ; 奧沙特隆(osaterone) ; 奧沙利鉑(oxaliplatin)(例如Floxatin)) ; 厄諾黴素(oxaunomycin) ; 太平洋紫杉醇(paclitaxel) ; 太平洋紫杉醇類似物 ; 太平洋紫杉醇衍生物 ; 巴拉烏胺(palauamine) ; 軟脂醯基唑欣(palmitoylrhizoxin) ; 帕米膦酸(pamidronic acid) ; 帕納三醇(panaxytriol) ; 帕諾米芬(panomifene) ; 帕拉巴汀(parabactin) ; 帕折普汀(pazelliptine) ; 培門冬酶(pegaspargase) ; 培得星(peldesine) ; 戊聚糖聚硫酸鈉 ; 噴司他丁(pentostatin) ; 洋托唑(pentozole) ; 潘氟隆(perflubron) ; 培磷醯胺(perfosfamide) ; 紫蘇子醇(perillyl alcohol) ; 芬那黴素(phenazinomycin) ; 苯基乙酸鹽 ; 磷酸酶抑制劑 ; 畢西巴尼(picibanil) ; 鹽酸匹魯卡品(pilocarpine hydrochloride) ; 吡柔比星(pirarubicin) ; 吡曲克辛(piritrexim) ; 普拉汀A(placetin A) ; 普

拉汀B(placetin B)；纖維蛋白溶酶原活化物製劑；鉑複合物；鉑化合物；鉑 - 三胺複合物；卟吩姆鈉 (porfimer sodium)；泊非羅黴素 (porfiromycin)；潑尼松 (prednisone)；丙基雙吡啶酮 (propyl bis-acridone)；前列腺素J2(prostaglandin J2)；蛋白酶體抑制劑；基於蛋白A之免疫調節劑；蛋白激酶C抑制劑；蛋白激酶C抑制劑，微藻；蛋白質酪胺酸磷酸酶抑制劑；嘌呤核苷磷酸化酶抑制劑；紫紅素(purpurins)；派拉瑞丁(pyrazoloacridine)；吡哆醛化血紅蛋白聚氧化乙烯結合物；raf拮抗劑；雷替曲塞(raltitrexed)；拉莫司瓊(ramosetron)；ras法呢基蛋白質轉移酶抑制劑；ras抑制劑；ras-GAP抑制劑；去甲基化瑞替普汀 (retelliptine demethylated)；依替膦酸銻 Re 186 (rhenium Re 186 etidronate)；根瘤菌素(rhizoxin)；核酶；RII瑞汀醯胺(RII retinamide)；羅希吐鹼(rohitukine)；羅莫肽(romurtide)；羅喹美克(roquinimex)；盧比龍 B1 (rubiginone B1)；盧伯 (ruboxyl)；沙芬戈 (safingol)；散特平 (saintopin)；SarCNU；塞克菲特 A (sarcophytol A)；沙格司亭 (sargramostim)；Sdi 1模擬物；司莫司汀(semustine)；衰老衍生抑制劑 1(senescence derived inhibitor 1)；有義寡核苷酸；信號轉導抑制劑；西索菲蘭 (sizofiran)；索布佐生 (sobuzoxane)；硼卡鈉 (sodium borocaptate)；苯基乙酸鈉；索維洛(solverol)；促生長因子結合蛋白；索納明(sonermin)；膦門冬酸(sparfosic acid)；斯卡黴素D(spicamycin D)；螺莫司汀 (spiromustine)；斯蘭羅皮汀 (splenopentin)；海綿抑素 1(spongistatin 1)；角鯊胺(squalamine)；斯蒂醯胺(stipiamide)；基質溶素抑制劑；索菲欣(sulfinosine)；超活性血管活性腸肽拮抗劑；蘇拉斯塔 (suradista)；蘇拉明 (suramin)；苦馬豆素 (swainsonine)；他莫司汀

(tallimustine)；他莫昔芬甲碘化物(tamoxifen methiodide)；牛磺莫司汀(tauromustine)；他紮羅汀(tazarotene)；替康蘭鈉(tecogalan sodium)；喃氟啉(tegafur)；碲吡喃鎘(tellurapyrylium)；端粒酶抑制劑；替莫泊芬(temoporfin)；替尼泊昔(teniposide)；四氯十氧化物；四唑明(tetrazomine)；噻立拉斯汀(thaliblastine)；噻可拉林(thiocoraline)；血小板生成素；血小板生成素模擬劑；胸腺法新(thymalfasin)；胸腺生長素受體促效劑；胸腺曲南(thymotrigan)；甲狀腺刺激激素；艾迪普林乙基錫(tin ethyl etiopurpurin)；替拉紮明(tirapazamine)；二氯化二茂鈦(titanocene bichloride)；特西汀(topsentin)；托瑞米芬(toremifene)；轉譯抑制劑；維甲酸(tretinoin)；三乙酰基尿昔(triacetyluridine)；曲西立濱(triciribine)；三甲曲沙；曲普瑞林(triptorelin)；特比司瓊(tropisetron)；妥羅雄脲(turosteride)；酪胺酸激酶抑制劑；泰福斯汀(tryphostins)；UBC抑制劑；烏苯美司(ubenimex)；泌尿生殖竇衍生長抑制因子；尿激酶受體拮抗劑；伐普肽(vapreotide)；維洛林B (variolin B)；維克替比(Vectibix) (帕尼單抗(panitumumab))；維拉雷索(velaresol)；凡拉明(veramine)；維汀(verdins)；維替泊芬(verteporfin)；長春瑞賓(vinorelbine)；維夏汀(vinxaltine)；維他欣(vitaxin)；伏羅唑(vorozole)；Welcovorin (甲醯四氫葉酸)；Xeloda (卡培他濱(capecitabine))；紮諾特隆(zanoterone)；折尼鉑(zeniplatin)；亞苳維(zilascorb)；及淨司他丁司他美(zinostatin stimalamer)。

5.5.3 治療病毒感染

在另一實施例中，本文提供一種治療患有病毒感染(例如)及活性病毒感染或潛伏病毒感染之個體之方法，其包含向該個體投與治療有效量之使

用本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞。在某些實施例中，個體缺乏T細胞，例如缺乏對個體病毒感染具有活性之T細胞。在某些實施例中，個體之T細胞太少。在某些實施例中，個體具有具受抑制活性之T細胞。在某些其他特定實施例中，除使用本文所描述之方法生產之該等抗原特異性T細胞之外，該投與包含向該個體投與免疫調節化合物，例如上述免疫調節化合物或沙力度胺，其中該量為例如可偵測地改善該病毒感染之一或多種症狀進展減輕或消除的量。在特定實施例中，病毒感染為因人類乳突狀瘤病毒(HPV)家族之病毒所致之感染。在特定實施例中，病毒感染為HPV。在特定實施例中，病毒感染為疱疹家族之成員。在特定實施例中，病毒感染為EBV。在特定實施例中，病毒感染為C型肝炎病毒(HCV)家族之成員。在特定實施例中，病毒感染為HCV。

在其他實施例中，作為包括一或多種其他抗病毒劑之抗病毒療法的一部分，向患有病毒感染之個體投與使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞。在其他實施例中，作為包括一或多種其他抗病毒劑之抗病毒療法的一部分，向處於罹患病毒感染風險下之個體投與使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞。可投與患有病毒感染之個體之特定抗病毒劑包括(但不限於)：咪喹莫特、普達非洛(podofilox)、鬼臼素酯(podophyllin)、干擾素 α (IFN α)、力替寇勒(reticolas)、壬苯醇醚-9(nonoxynol-9)、阿昔洛韋(acyclovir)、泛昔洛韋(famciclovir)、伐昔洛韋(valaciclovir)、更昔洛韋(ganciclovir)、西多福韋(cidofovir)；金剛胺(amantadine)、金剛乙胺(rimantadine)；利巴韋林(ribavirin)；紮那米韋(zanamavir)及奧司他韋(oseltaumavir)；蛋白酶抑制劑，諸如茚地那韋(indinavir)、奈非那韋(nelfinavir)、利托那韋(ritonavir)或沙奎那韋

(saquinavir)；核苷逆轉錄酶抑制劑，諸如地達諾新(didanosine)、拉米夫定(lamivudine)、司他夫定(stavudine)、紮西他濱(zalcitabine)或齊多夫定(zidovudine)；及非核苷逆轉錄酶抑制劑，諸如奈韋拉平(nevirapine)或依法韋侖(efavirenz)。

5.5.4 投與

在某些實施例中，利用使用本文所描述之方法生產之T細胞(例如抗原特異性T細胞)例如以產生針對個體之可偵測治療效益之任何量或數目(例如有效量)投與個體，其中該個體患有病毒感染、癌症或具有腫瘤細胞，例如具有腫瘤細胞、實體腫瘤或患有血液癌之個體，例如癌症患者。此類細胞可藉由細胞之絕對數目投與此類個體，例如該個體可投與約、至少約或至多約 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 或 1×10^{11} 個使用本文所描述之方法生產之T細胞。在其他實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞可藉由細胞之相對數目投與此類個體，例如該個體可投與約、至少約或至多約 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 或 1×10^{11} 個使用本文所描述之方法生產之T細胞/個體公斤數。在其他實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞可藉由細胞之相對數目投與此類個體，例如該個體可投與約、至少約或至多約 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 個使用本文所描述之方法生產之T細胞/個體公斤數。

在某些實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞根據個體之體表面積投與個體。在某些實施例中，使用本文所描述之方法生

產之抗原特異性T細胞以 1×10^7 至 1×10^{10} 個細胞/平方公尺之劑量投與個體。在某些實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞以 5×10^7 、 1.5×10^8 、 4.5×10^8 、 1.3×10^9 或 2×10^9 個細胞/平方公尺之劑量投與個體。在一特定實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞以 5×10^7 個細胞/平方公尺之劑量投與個體。在一特定實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞以 1.5×10^8 個細胞/平方公尺之劑量投與個體。在一特定實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞以 4.5×10^8 個細胞/平方公尺之劑量投與個體。在一特定實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞以 1.3×10^9 個細胞/平方公尺之劑量投與個體。在一特定實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞以 2×10^9 個細胞/平方公尺之劑量投與個體。在其他實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞以 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 或 1×10^{10} 個細胞/公斤數之劑量投與個體。

在某些實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞之前，個體經歷白血球清除術。在某些實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞之前，個體接受第一療法。在特定實施例中，第一療法為化學療法。在特定實施例中，第一療法為1、2、3、4、5或6輪之化學療法。在更特定實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞之前，個體接受一輪之化學療法。在更特定實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞之前，個體接受兩個輪之化學療法。在更特定實施例中，在投與使用本文所描述之

方法生產的抗原特異性T細胞之前，個體接受三輪之化學療法。在更特定實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞之前，個體接受四輪之化學療法。在更特定實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞之前，個體接受五輪之化學療法。在更特定實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞之前，個體接受六輪之化學療法。

在某些實施例中，在白血球清除術後，歷經28天之過程製造、測試且釋放待投與至個體之T細胞以供使用。在某些實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞之前，個體經歷淋巴球耗盡療程 (lymphodepletion regiment)。在某些實施例中，淋巴球耗盡療程為1、2、3、4、5或6天。在特定實施例中，淋巴球耗盡療程為3天。在某些實施例中，淋巴球耗盡療程為單一藥劑淋巴球耗盡療程。在某些實施例中，淋巴球耗盡療程為兩種藥劑淋巴球耗盡療程。在某些實施例中，單一藥劑為環磷醯胺。在某些實施例中，兩種藥劑為環磷醯胺及氟達拉濱。在某些實施例中，環磷醯胺以300毫克/平方公尺/天投與。在特定實施例中，環磷醯胺以300毫克/平方公尺/天投與三天。在某些實施例中，環磷醯胺以900毫克/平方公尺/天投與。在特定實施例中，環磷醯胺以900毫克/平方公尺/天投與三天。在某些實施例中，環磷醯胺以300毫克/平方公尺/天投與且氟達拉濱以30毫克/公斤/天投與。在特定實施例中，環磷醯胺以300毫克/平方公尺/天投與三天且氟達拉濱以30毫克/公斤/天投與兩天。在某些實施例中，在淋巴球耗盡療程之最後一天後，開始投與使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞1、2、3、4或5天。在特定實施例中，在淋巴球耗盡療程之最後一天後，開始投與使用本文所描述之方法生產之抗

原特異性T細胞兩天。

在某些實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞之前，向個體投與乙醯胺苯酚(acetaminophen)。在某些實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞之前，向個體投與苯海拉明(diphenhydramine)。在某些實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產的抗原特異性T細胞之前，向個體投與乙醯胺苯酚及苯海拉明。在某些實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞後，向個體投與乙醯胺苯酚(acetaminophen)。在特定實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞後，投與乙醯胺苯酚四小時。在某些實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞後，向個體投與苯海拉明。在特定實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞後，投與苯海拉明四小時。在某些實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞後，向個體投與乙醯胺苯酚及苯海拉明。在特定實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞後，投與乙醯胺苯酚及苯海拉明四小時。在某些實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞前後，向個體投與乙醯胺苯酚。在某些實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞前後，向個體投與苯海拉明。在某些實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞前後，向個體投與乙醯胺苯酚及苯海拉明。在某些實施例中，乙醯胺苯酚經口投與。在某些實施例中，苯海拉明經口投與。在某些實施例中，苯海拉明經靜脈內投與。在某些實施例中，苯海拉明經肌內投與。在某些實施例中，乙醯胺苯酚以300-1000 mg之劑量投與。在特定實施例中，乙醯胺苯酚以650

mg之劑量投與。在某些實施例中，苯海拉明以10-40 mg之劑量投與。在特定實施例中，苯海拉明以25 mg之劑量投與。在一特定實施例中，在投與使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞前後，乙醯胺苯酚以650 mg經口投與且苯海拉明以25 mg經口投與。

在抗癌療法過程期間使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞可一次性投與患有病毒感染之個體、患有癌症之個體或具有腫瘤細胞(是否可偵測或不可偵測)之個體；或可在療法期間多次投與，例如每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小時一次，或每1、2、3、4、5、6或7天一次或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、24、36週或更多週一次。在特定實施例中，在抗癌療法過程期間，使用本文所描述之方法生產之T細胞一次性投與患有病毒感染之個體、患有癌症之個體或具有腫瘤細胞之個體。在特定實施例中，在抗癌療法過程期間，使用本文所描述之方法生產之T細胞一次性投與處於風險罹患病毒感染下之個體、處於罹患癌症風險下之個體或處於罹患腫瘤細胞風險下之個體。在特定實施例中，在抗癌療法過程期間，使用本文所描述之方法生產之T細胞一次性投與個體以預防病毒感染、癌症或腫瘤細胞之復發。在特定實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞可每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小時一次性地投與患有病毒感染之個體。在特定實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞可每1、2、3、4、5、6或7天一次性地投與患有病毒感染之個體。在特定實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞可每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、24、36週或更多週一次性地投與患有病毒感

染之個體。在特定實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞可每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小時一次性地投與患有癌症之個體。在特定實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞可每1、2、3、4、5、6或7天一次性地投與患有癌症之個體。在特定實施例中，使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞可每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、24、36週或更多週一次性地投與患有癌症之個體。在使用細胞及抗病毒化合物或抗癌化合物之實施例中，抗病毒化合物或抗癌化合物及細胞可例如於相同調配物中一同投與個體；例如於分開調配物中在大約相同時間分開投與；或可例如於不同給藥時程或在不同天數時間分開投與。可在不考慮是否已在過去向個體投與使用本文所描述之方法生產之T細胞的情況下投與使用本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞。在一個實施例中，T細胞在第二劑之前投與個體。在另一實施例中，第二劑在T細胞之前投與。在另一實施例中，T細胞及第二劑同時投與。

5.6 套組

本文提供一種醫藥封裝或套組，其包含一或多個容器，該一或多個容器包含本文所描述之組合物中之一或多者，例如包含藉由本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞的組合物。該套組可獨立使用或與可自動化細胞生產機器一起使用，以便產生本文所描述之T細胞。視需要與該(等)容器相關聯的可為由管理醫藥或生物產品之製造、使用或銷售之政府機構所規定形式的注意事項，該注意事項反映由人類投藥之製造、使用或銷售機構之批准。

本文所涵蓋之套組可根據本文所描述之方法(例如治療癌症之方法及/

或治療病毒感染之方法)來使用。在一個實施例中，套組在一或多個容器中包含藉由本文所描述之方法生產之抗原特異性T細胞或其組合物。在一特定實施例中，本文提供一種包含藉由本文所描述之方法生產之T細胞群體或其組合物的套組。在另一實施例中，本文提供一種包含為藉由本文所描述之方法生產抗原特異性T細胞所需的組分(例如培養基或其組分)之套組。

在一個實施例中，套組(i)在一或多個容器中包含藉由本文所描述之方法生產之T細胞或其組合物，及(ii)在一或多個容器中包含乙醯胺苯酚，及/或(iii)在一或多個容器中包含苯海拉明。在一個實施例中，套組(i)在一或多個容器中包含藉由本文所描述之方法生產之T細胞或其組合物，及(ii)在一或多個容器中包含環磷醯胺，及/或(iii)在一或多個容器中包含氟達拉濱。在一個實施例中，套組(i)在一或多個容器中包含藉由本文所描述之方法生產之T細胞或其組合物，及(ii)在一或多個容器中包含乙醯胺苯酚，及/或(iii)在一或多個容器中包含苯海拉明，及(iv)在一或多個容器中包含環磷醯胺，及/或(v)在一或多個容器中包含氟達拉濱。

6. 實例

本文提供關於本文所描述之不同方法之資料，該等方法可用以確立本文所描述之廣泛範圍之可能條件。所提供之特定實例不排除其他實施例之可能性。

6.1 實例1：APC誘導混合物

在HPV T細胞產生中評估APC誘導混合物之組合(表2)。

表2. APC誘導混合物之組合

條件編號	細胞介素混合物描述
C1	IL-4/CD40L
C2	IL-4/CD40L/CpG

C3	GM-CSF/IFN- α
C4	GM-CSF/IL-4 + TNF- α /IL-1 β /IL-6
C5	GM-CSF/IL-4/CD40L
C6	GM-CSF/IL-4/CD40L/CpG
C7	GM-CSF/IFN- α /IL-4/CD40L
C8	GM-CSF/IFN- α /IL-4/CD40L/CpG
C9	GM-CSF/IL-4/CD40L+ TNF- α /IL-1 β /IL-6
C10	GM-CSF/IL-4/CD40L/CpG + TNF- α /IL-1 β /IL-6

自初始接種直至最終T細胞收集，在G-REX®-24中培養PBMC。自過程除去PGE₂。在HPV PEPMIX™刺激之前，將PBMC與APC誘導細胞介素一起培育3天。此實驗中之其他過程元素在表3中列出。

表3. APC誘導混合物實驗之其他參數.

參數	條件
PBMC	新鮮
誘導細胞介素	各種
IL-4	40 ng/ml
CD40L	1 μ g/ml
CpG	4 μ g/ml
GM-CSF	800 U/ml
IFN- α -2b	1000 U/ml
TNF- α	10 ng/ml
IL-1 β	10 ng/ml
IL-6	10 ng/ml
誘導培養基	IMDM
接種密度	5 \times 10e6個/孔
再現性	重複/條件
誘導持續時間	3天
PEPMIX™	1 μ g/ml
細胞介素饋送延遲	48小時
T細胞擴增細胞介素	
IL-4	55 ng/ml
IL-7	10 ng/ml
IL-15	1 ng/ml
擴增持續時間	13天

在抗原加載後第13天收集後，使用ViCELL XR對細胞數目進行計數。如圖1中所示，在相同APC誘導條件下在不同供體中在不同程度上擴增之細胞介於約2倍至6倍擴增範圍內。HPV T細胞頻率及產量分別展示在圖2及3中。HPV T細胞產量考慮總細胞產量及HPV T細胞頻率兩者，使其

成為培養條件評估之合理因素。因此，藉由對相同條件之重複之T細胞產量取平均值來獲得平均HPV T細胞產量。

6.2 實例2：擴增細胞介素

定義擴增細胞介素之實驗設計針對各細胞介素使用以下濃度範圍：IL-4，15 ng/ml至55 ng/ml；IL-7，10 ng/ml至50 ng/ml；IL-15，1 ng/ml至10 ng/ml。不包括IL-4 (僅IL-7 + IL-15)及IL-15 (僅IL-4 + IL-7)。詳述條件以表4形式列出。該過程使用如表5中所示之具有CpG、sCD40L及IL-4之1天APC誘導。所使用PEPMIX™之劑量為1 µg/ml。

表4. 擴增細胞介素組合.

回合	APC誘導	接種密度	IL-15	IL-4	IL-7	擴增天數
C1	IL-4 10 ng/ml， CD40L 1µg/ml，CpG 4µg/ml	1.75 M/CM ²	1 ng/ml	15 ng/ml	10 ng/ml	12天
C2			1 ng/ml	15 ng/ml	50 ng/ml	
C3			1 ng/ml	35 ng/ml	30 ng/ml	
C4			1 ng/ml	55 ng/ml	10 ng/ml	
C5			1 ng/ml	55 ng/ml	50 ng/ml	
C6			5.5 ng/ml	15 ng/ml	10 ng/ml	
C7			5.5 ng/ml	15 ng/ml	50 ng/ml	
C8			5.5 ng/ml	35 ng/ml	30 ng/ml	
C9			5.5 ng/ml	55 ng/ml	10 ng/ml	
C10			5.5 ng/ml	55 ng/ml	50 ng/ml	
C11			10 ng/ml	15 ng/ml	10 ng/ml	
C12			10 ng/ml	15 ng/ml	50 ng/ml	
C13			10 ng/ml	35 ng/ml	30 ng/ml	
C14			10 ng/ml	55 ng/ml	10 ng/ml	
C15			10 ng/ml	55 ng/ml	50 ng/ml	
C16			0	55 ng/ml	10 ng/ml	
C17			5.5 ng/ml	0	30 ng/ml	

表5. 擴增細胞介素組合實驗之APC誘導條件.

試劑	儲備濃度	最終濃度	2×細胞介素混合物	體積/1 ml
IL-4	100 µg/ml	20 ng/ml	40 ng/ml	0.4 µl
CD40L	500 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µl
CpG	4 mg/ml	5 ug/ml	10 µg/ml	2.5 µl

在圖4中說明收集時之總細胞擴增。T細胞在更低IL-15濃度(IL-15 = 1 ng/ml)下比更高濃度(IL-15 = 5.5或10 ng/mL)之T細胞具有顯著更低之擴增。IL-15濃度在5.5 ng/ml與10 ng/ml之間無差異。無IL-15之條件具有

最小之擴增，而無IL-4之條件不影響T細胞擴增。

藉由ICCS量測T細胞頻率(圖5)。在不同細胞介素擴增條件下在所有供體中，ICCS展示T細胞頻率之廣泛範圍之變化。在所有供體中，無IL-15之條件成功地產生T細胞，但頻率比其他條件下之頻率更低。對於T細胞頻率，其中三種細胞介素之濃度最高(IL-4 = 55 ng/mL，IL-7 = 50 ng/ml且IL-15 = 10 ng/ml)之條件在雙重複中具有較小變化，且在頂部清單上。

考慮T細胞擴增及T細胞頻率，在圖6中說明T細胞產量。在所有供體中，無IL-15或具有更低濃度(1 ng/ml)之IL-15之條件產生更少的HPV T細胞。其中三種細胞介素之濃度最高(IL-4 = 55 ng/ml，IL-7 = 50 ng/ml且IL-15 = 10 ng/ml)之條件具有最高之T細胞產量且在雙重複中具有較小變化。

除ICCS分析以外，藉由8叢細胞基質珠粒陣列(CBA)量測分泌之細胞介素。小組包括Th1細胞介素(IL-2、IFN- γ 及TNF- α)、Th2細胞介素(IL-5、IL-13)、Treg (IL-10)及與T細胞效應功能相關之細胞介素(顆粒酶B及GM-CSF)。關於分泌之細胞介素，在量及種類方面看出供體差異。無IL-4之條件分泌相對更高量之IFN- γ ，而無IL-15之條件具有最小量之IFN- γ 。其中三種細胞介素之濃度最高(IL-4 = 55 ng/mL，IL-7 = 50 ng/ml且IL-15 = 10 ng/ml)之條件為具有更高的Th1細胞介素及更低的Th2或Treg細胞介素之條件中之一者。

亦藉由抗體染色及流式細胞儀分析在2/4個供體中量測T細胞分化標記物。如圖7中所示確定CD45RO陽性T細胞群體內之Tcm、Tem及Teff百分比。亦確定CD45RO+CD62Lhi T細胞群體(圖8)，因為據報導在授受性

T細胞療法中其與臨床功效具有正相關性。在擴增12天後，在一個供體中大多數T細胞為效應T細胞。由於大於80%之T細胞為效應子，因此在不同細胞介素條件下難以看出其分化標記物之任何差異。在其他供體中，明確展示更高的IL-15濃度使更多的T細胞分化。無IL-15之條件具有更高之Tcm及較少之Teff。然而，CD45RO+CD62Lhi群體不存在顯著差異。

6.3 實例3：APC誘導持續時間

將冷凍之PBMC連續融化三天，且用如表6中所示之APC誘導混合物處理，以在不同APC誘導持續時間後用於同時HPV PEPMIX™刺激。在存在或不存在2 ng/ml IL-7下，用APC誘導混合物刺激PBMC 3天。在表6中展示APC誘導條件，且在表7中列出一般實驗條件。

表6. APC誘導條件.

條件編號	APC誘導混合物	持續時間	IL-7	第-3天	第-2天	第-1天
1	IL-4/CD40L	3天	-	IL-4/CD40L		
2	IL-4/CD40L/CpG	3天	-	IL-4/CD40L/CpG		
3	GM-CSF/IFN- α	3天	-	GM-CSF/IFN- α		
4	GM-CSF/IFN- α /IL-4/CD40L/CpG	3天	-	GM-CSF/IFN- α /IL-4/CD40L/CpG		
5	IL-4/CD40L	3天	+	IL-4/CD40L + IL-7		
6	IL-4/CD40L/CpG	3天	+	IL-4/CD40L/CpG + IL-7		
7	GM-CSF/IFN- α	3天	+	GM-CSF/IFN- α + IL-7		
8	GM-CSF/IFN- α /IL-4/CD40L/CpG	3天	+	GM-CSF/IFN- α /IL-4/CD40L/CpG + IL-7		
9	GM-CSF/IFN- α + IL-4/CD40L + CpG	3天	-	GM-CSF/IFN- α	IL-4/CD40L	CpG
10	GM-CSF/IFN- α + IL-4/CD40L + CpG	3天	+	GM-CSF/IFN- α /IL-7	IL-4/CD40L	CpG
11	IL-4/CD40L	2天	-		IL-4/CD40L	

12	IL-4/CD40L/CpG	2天	-		IL-4/CD40L/CpG	
13	GM-CSF/IFN- α	2天	-		GM-CSF/IFN- α	
14	GM-CSF/IFN- α /IL-4/CD40L/CpG	2天	-		GM-CSF/IFN- α /IL-4/CD40L/CpG	
15	IL-4/CD40L	1天	-			IL-4/CD40L
16	IL-4/CD40L/CpG	1天	-			IL-4/CD40L/CpG
17	GM-CSF/IFN- α	1天	-			GM-CSF/IFN- α
18	GM-CSF/IFN- α /IL-4/CD40L/CpG	1天	-			GM-CSF/IFN- α /IL-4/CD40L/CpG

表7. APC誘導持續時間實驗之其他實驗參數.

參數	條件
供體號	4
PBMC	冷凍
誘導細胞介素	各種
IL-4	20 ng/ml
CD40L	1 μ g/ml
CpG	4 μ g/ml
GM-CSF	800 U/ml
IFN- α -2b	1000 U/ml
IL-7	2 ng/ml
誘導培養基	T細胞培養基
接種密度	5×10^6 個/孔
再現性	重複/條件
誘導持續時間	1/2/3天
PEPMIX™	1 μ g/ml
細胞介素饋送延遲	48小時
擴增細胞介素	
IL-4	55 ng/ml
IL-7	50 ng/ml
IL-15	9 ng/ml
擴增持續時間	12天

在抗原加載後第12天收集後，使用ViCELL XR對細胞數目進行計數。如圖9中所示，在HPV PEPMIX™刺激後，經IL-4及CD40L處理之細胞產生最高產量，而不管APC誘導之持續時間有多長，GM-CSF及IFN- α 誘導之條件展示最低之細胞擴增。對於既定之誘導混合物，不同APC誘導持續時間之間的細胞擴增能力不存在顯著差異，例外為4號供體之細胞產

量在1天誘導後明顯低於在2或3天誘導後之細胞產量(圖9)。與並行添加相比，混合物IL-4/CD40L/CpG/GMCSF/IFN- α 中組分之依序添加似乎影響細胞擴增。在APC誘導期間IL-7之存在(即使有的話)最低限度地提高細胞產量。

使用ICCS鑑別HPV T細胞。與細胞擴增之趨勢相反，與來自其他APC誘導混合物處理之細胞相比較，在既定之APC誘導持續時間裏，由GM-CSF及IFN- α 誘導之PBMC產生之T細胞展示最高的HPV T細胞頻率(圖10)。在存在或不存在IL-7下，IL-4/CD40L/CpG/GMCSF/IFN- α 之混合物組分之依序添加或多或少地提高HPV T細胞頻率。

在圖11中展示HPV T細胞產量。不同條件之T細胞產量之模式類似於如圖10中所示之T細胞頻率之模式，但一般而言差異之程度較小。

6.4 實例4：生長曲線定義

藉由使用11個健康供體之PBMC設計實驗以解決以下目標：定義當前T細胞過程之生長曲線，定義T細胞信號之持續時間，定義在不同天數T細胞收集物中之T細胞純度，探究T細胞分化標記物之機構動力學，及產生用於多個供體中之微陣列分析及組成IP之產品材料。

為確定生長曲線及細胞倍增時間，如圖12中所示繪製來自11個供體之總細胞數目之平均值 \pm SD。Y軸表示總細胞數目且X軸表示抗原加載後之天數。藉由使用線上軟體(<http://www.doubling-time.com/compute.php?lang=en>)計算細胞倍增時間。

藉由ViCell量測細胞活力及細胞大小，且結果如圖13中所示。細胞活力在第12天後開始下降且其在第16天更低。隨著培養延長，細胞大小亦減小。在第12天細胞之平均直徑為約9至10 μm ，其在第16天下降至8

μm。

在圖14中展示細胞數目、擴增倍數、T細胞頻率及T細胞產量。自12天至16天，隨著培養延長，總細胞數目或擴增倍數增加。在第12天平均倍數變化為約7且其在第16天達至大於10倍。在第12天與第16天之間，T細胞頻率不存在顯著變化。由於總T細胞產量具有更大程度之細胞擴增，因此其在第16天比第12天或第14天更高。

使用CD19、CD56、CD3、CD11c、CD4及CD8之T細胞純度組，藉由抗體染色及流式細胞測量術分析來定義T細胞純度。結果展現第12天所有供體之T細胞純度大於85%，且其隨著培養延長而稍微增加。小百分比之非T細胞主要為NK及NKT細胞。所有供體之B細胞小於1%。由此過程產生之大多數T細胞為CD4 T細胞，其佔約80%。隨著培養延長，CD4/CD8 T細胞比率降低。參見圖15及圖16。

亦使用CD3、CD62L、CD4、CD27、CCR7及CD45RO之T細胞分化組，藉由抗體染色及流式細胞測量術分析來檢查T細胞分化狀態。第12天至第16天，CD45RO+記憶T細胞群體增加。在第12天、第14天與第16天之間，CD45RO+CD62Lhi群體不存在顯著差異(圖17)。在CD45RO+群體內，中央記憶T細胞之百分比降低，而效應T細胞群體增加(圖18)。

自所有11個供體產生HPV抗原特異性T細胞。確定生長曲線；對數期在8至13天之間。T細胞純度隨著培養延長而增加。第12天10/11個供體純度大於85%。在第14天後，所有供體之純度大於90%。非T細胞群體主要為NK及NK T細胞，小於B細胞之1%。第12天至第16天，T細胞擴增及T細胞產量顯著增加，然而同時細胞活力降低且細胞大小減小，以及表型更加分化。

6.5 實例5：接種密度及細胞介素混合物濃度

此實驗之目的為針對HPV T細胞激活及增殖，確定最優PBMC接種密度及APC誘導細胞介素混合物之工作濃度。如表8中所示在G-REX®-24之孔中以不同密度接種新鮮PBMC。

表8. PBMC接種密度條件.

條件編號	密度(細胞數/孔)	IL-4 (ng/ml)	CD40L (µg/ml)
1	2.50E+06	10	0.25
2	2.50E+06	10	1
3	2.50E+06	10	4
4	2.50E+06	40	0.25
5	2.50E+06	40	1
6	2.50E+06	40	4
7	5.00E+06	10	0.25
8	5.00E+06	10	1
9	5.00E+06	10	4
10	5.00E+06	40	0.25
11	5.00E+06	40	1
12	5.00E+06	40	4
13	1.00E+07	10	0.25
14	1.00E+07	10	1
15	1.00E+07	10	4
16	1.00E+07	40	0.25
17	1.00E+07	40	1
18	1.00E+07	40	4

由於G-REX®-24孔之底表面之面積為 2cm^2 ，因此 1×10^7 個/孔、 5×10^6 個/孔及 2.5×10^6 個/孔之接種密度分別等於 5×10^6 個/平方公分、 2.5×10^6 個/平方公分及 1.25×10^6 個/平方公分。在HPV PEPMIX™刺激之前，用各種濃度之APC誘導混合物IL-4及CD40L處理細胞24小時。在表9中列出一般實驗條件。

表9. PBMC接種密度實驗之其他參數.

參數	條件
供體號	3
PBMC	新鮮
誘導細胞介素	
IL-4	10及40 ng/ml
CD40L	0.25、1及4 µg/ml

誘導培養基	T細胞培養基
接種密度	2.5、5、10 × 10 ⁶ 個/孔
再現性	重複/條件
誘導持續時間	1天
PEPMIX™	1 µg/ml
細胞介素饋送延遲	48小時
T細胞擴增細胞介素	
IL-4	55 ng/ml
IL-7	50 ng/ml
IL-15	9 ng/ml
T細胞擴增持續時間	14天

所有三個供體展示相同的趨勢：總細胞產量與接種密度成正比，而擴增倍數與接種密度成反比。未觀測到不同IL-4及CD40L濃度對擴增倍數變化之顯著影響。

亦分析HPV T細胞頻率(圖19)。一般而言，最高之HPV T細胞頻率由PBMC以最高密度(1×10^7 個/孔)接種之條件產生。HPV T細胞頻率與接種密度成正比。在所有三個供體中，關於不同濃度之IL-4或CD40L對HPV T細胞頻率之影響，無清晰模式。

圖20中展示HPV T細胞產量。HPV T細胞產量之模式與HPV T細胞頻率相當。由於來自細胞產量及T細胞頻率兩者之增加效應，不同接種密度對T細胞產量之影響比對T細胞頻率更明顯。除了一項來自1號供體之條件以外，在所有供體中，接種密度為 1×10^7 個/孔之所有條件優於具有更低接種密度之其他條件。在接種密度為 1×10^7 個/孔之6項APC誘導條件之間進行的統計分析展示無顯著差異($P > 0.05$)。

本文呈現之結果展示 5×10^6 個/平方公分 (1×10^7 個/孔)之接種密度產生最高之HPV T細胞產量，且IL-4及sCD40L之工作濃度分別為10-40 ng/ml及0.25-4 µg/ml。

6.6 實例6：過程表徵

本文中研究某些過程元素。在APC誘導期間使用IMDM及T細胞培養

基以用於比較。在先前定義實驗中，針對4種HPV PEPMIX™類型中之每一者，已以1 µg/ml使用HPV PEPMIX™。在此實驗中，針對最佳劑量確定，以0.5、1及2 µg/ml投加HPV PEPMIX™。亦藉由延遲IL-4/IL-7/IL-15添加直至HPV PEPMIX™加載後2小時、24小時及48小時，來界定初始T細胞擴增細胞介素補充之時序。當T細胞擴增細胞介素在48小時延遲後添加時，亦評估存在於整個T細胞擴增中或在初始饋送後中斷之IL-4。在表10中概述實驗設計。在表11中展示一般實驗條件。

表10. 整個過程之實驗條件.

條件編號	APC誘導培養基	PEPMIX™劑量	細胞介素添加延遲	IL-4饋送
C1	IMDM	1 µg/ml	2小時	全部
C2	IMDM	1 µg/ml	24小時	全部
C3	IMDM	1 µg/ml	48小時	全部
C4	IMDM	1 µg/ml	48小時	第一饋送
C5	T細胞	1 µg/ml	2小時	全部
C6	T細胞	1 µg/ml	24小時	全部
C7	T細胞	1 µg/ml	48小時	全部
C8	T細胞	1 µg/ml	48小時	第一饋送
C9	T細胞	0.5 µg/ml	48小時	全部
C10	T細胞	2 µg/ml	48小時	全部

表11. 整個過程實驗之其他參數.

參數	條件
供體號	3
PBMC	新鮮
誘導細胞介素	
IL-4	10 ng/ml
CD40L	1 µg/ml
誘導培養基	IMDM/T細胞培養基
接種密度	1 × 10 ⁷ 個/孔
再現性	重複/條件
APC誘導持續時間	1天
PEPMIX™	0.5、1及2 µg/ml
第一細胞介素饋送延遲	2、24及48小時
T細胞擴增細胞介素	
IL-4	55 ng/ml

IL-7	50 ng/ml
IL-15	9 ng/ml
T細胞擴增持續時間	12天

對於APC誘導混合物，所使用之IL-4及CD40L分別為10 ng/ml及1 µg/ml。此外，以 1×10^7 個/孔接種PBMC。使HPV T細胞擴增12天。

除ICCS以外，在進行抗原再刺激時，亦使用細胞珠粒陣列量測T細胞之細胞介素概況。在表12中列出經量測之細胞介素。

表12. 抗原刺激時以細胞介素概況之形式量測之細胞介素.

類型	細胞介素
Th1	IL-2、TNF- α 、IFN- γ
Th2	IL-5、IL-13
促炎型	GM-CSF
免疫調節型	IL-10
細胞毒性	顆粒酶B

在過程完成後，亦在收集之T細胞中分析Th1 (T-bet)、Th2 (GATA-3)及Treg (FoxP3)之轉錄因子。

HPV PEPMIX™刺激後第12天收集T細胞。如實驗程序中所描述使用ViCell對活細胞進行計數。圖21中展示細胞擴增倍數之結果。

結果展示在T細胞培養基用作所有供體之APC誘導培養基之條件下，獲得更高的細胞擴增倍數。另外，細胞擴增倍數與細胞介素延遲時長成反比。此外，IL-4中斷稍微地提高細胞擴增。在1號及2號供體中，以0.5及1 µg/ml投加之HPV PEPMIX™不展示對細胞擴增能力具有明顯作用，而2 µg/ml HPV PEPMIX™似乎影響細胞產量。在供體3號中，省略T細胞擴增細胞介素及培養基至接受0.5及2 µg/ml PEPMIX™之細胞之第一饋送，因此對於此供體，在整個實驗中不與1 µg/ml進行比較。

分析HPV T細胞頻率且在圖22中展示。在IMDM培養基用作所有供體之APC誘導培養基之許多條件下，尤其在HPV T細胞頻率對既定供體

(諸如2號供體)而言通常較低之情況下，獲得更高之HPV T細胞頻率。另外，在1號供體下，HPV T細胞頻率與細胞介素延遲時長成正比。對於2號及3號供體，不同細胞介素延遲之間的HPV T細胞頻率之差異不明顯，例外為在3號供體中，24小時及48小時延遲比2小時延遲產生稍微更高的HPV T細胞。在IMDM用於APC誘導時，IL-4中斷稍微提高HPV T細胞頻率，但此提高在T細胞培養基用於APC誘導之條件下不顯現。在1號及2號供體中，2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之HPV PEPMIX™刺激最高之HPV T細胞頻率。在1號供體中，在所有測試條件下，使用0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HPV PEPMIX™之刺激產生最低之HPV T細胞頻率。

在圖23中展示HPV T細胞產量。T細胞產量展示與HPV T細胞頻率類似之模式。在IMDM培養基用作所有供體之APC誘導培養基之許多條件下，尤其在HPV T細胞頻率對既定供體(諸如2號供體)而言通常較低之情況下，獲得稍微更高之HPV T細胞產量。另外，在1號供體下，HPV T細胞產量與細胞介素延遲時長成正比。對於2號及3號供體，不同細胞介素延遲之間的HPV T細胞頻率之差異不明顯，例外為在3號供體中，24小時及48小時延遲比2小時延遲產生稍微更高的HPV T細胞。在IMDM用於APC誘導時，IL-4中斷稍微提高HPV T細胞產量，但此提高在T細胞培養基用於APC誘導之條件下不顯現。在1號及2號供體中，2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之HPV PEPMIX™比1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 對應體刺激稍微更高之HPV T細胞產量。在1號供體中，在所有測試條件下，使用0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HPV PEPMIX™之刺激產生最低之HPV T細胞頻率。

在此實驗中，特定地設計若干條件以分析藉由預致敏HPV T細胞之Th1細胞介素IFN- γ 產生；因此，除總HPV T細胞分析以外，亦進行IFN- γ

產生HPV T細胞分析。在圖24中展示IFN- γ 產生HPV T細胞頻率之結果。不同於圖22中之總HPV T細胞頻率之趨勢，使用用於APC誘導之IMDM培養之大多數細胞比APC誘導期間使用T細胞培養基之其對應培養物產生更高的IFN- γ 產生T細胞頻率。在2號供體之細胞中，幾乎不可偵測到IFN- γ 產生T細胞。在IMDM誘導條件內，在對IFN- γ 產生細胞頻率的影響方面，24小時細胞介素添加延遲展示與48小時細胞介素添加延遲相當(即使不更高的話)。在IMDM誘導條件下，在T細胞擴增期間IL-4戒斷稍微提高所有測試供體中之IFN- γ 產生HPV T細胞頻率。

亦量測抗原再刺激時由HPV T細胞分泌之細胞介素。為探索在不同培養條件下哪種T輔助細胞子集-Th1或Th2輔助細胞-在HPV T細胞產物中佔優勢，藉由代表性Th1細胞介素IFN- γ 含量除以代表性Th2細胞介素IL-5含量，獲得Th1/Th2比率(圖25)。Th1/Th2之比值愈高，微環境中之Th1反應愈佔優勢。一般而言，使用用於APC誘導之IMDM培養之細胞顯示之Th1/Th2比值高於使用T細胞培養基培養之細胞。添加擴增細胞介素之細胞直到24小時後所顯示之Th1/Th2比值高於其在48小時後之比值。

為進一步分析APC誘導培養基及在T細胞擴增期間連續存在之IL-4對T細胞子集分化的影響，在HPV PEPMIX™刺激後48小時之前不提供T細胞擴增細胞介素混合物的條件下，檢測Th1 (T-bet)、Th2 (GATA-3)及Treg (FoxP3)之轉錄因子(圖26)。在APC誘導期間，用T細胞培養基培養之細胞顯示的CD4+T-bet+Th1細胞之頻率稍高於使用IMDM培養之細胞。關於APC誘導培養基對CD4+GATA-3+Th2細胞頻率之影響，無清晰模式，因此Th1/Th2比值的模式亦與Th1頻率兼容。另外，在用IMDM作為APC誘導培養基培養時獲得稍高百分比之Treg。T細胞擴增期間，脫除IL-

4之影響顯示Th1頻率明顯改善，且Th2頻率明顯降低，與IL-4存在於整個T細胞擴增階段中之對應條件相比較，Th1/Th2比值升高。此表示移除IL-4時，使T細胞反應朝向Th1偏移。

6.7 實例7：實例T細胞生產方案

此實例描述產生抗原特異性T細胞之數個方案。

方案1：自個體獲得白血球清除術單元。自該單元分離PBMC且冷凍在包含含在血漿-Lyte™中之40% v/v HSA及5% DMSO之調配物中。在第0天，解凍PBMC且培養，且在6孔培養盤中，在包含IL-4 (10 ng/mL)及CD40L (1 µg/mL)之IMDM培養基中開始APC誘導。在第1天，使用T細胞培養基活化PBMC內之T細胞，該T細胞培養基包含1 µg/mL之衍生自至少一種病毒或腫瘤抗原之PepMix。在第2天，在包含55 ng/mL IL-4、50 ng/mL IL-7及9 ng/mL IL-15之T細胞培養基中擴增T細胞。在第5、8及11天，用包含50 ng/mL IL-7及9 ng/mL IL-15之T細胞培養基替代該培養基。在第13天，收集T細胞，將其用離心機濃縮且用包含10% v/v HSA之血漿-Lyte™洗滌至少一次。隨後用包含10% v/v HSA及6% w/v 聚葡萄糖-40之血漿-Lyte™再懸浮細胞，且用包含RPMI培養基(32% v/v)、12.5% w/v HSA及5% v/v DMSO之溶液將其稀釋至 $1-20 \times 10^6$ 個細胞/毫升之最終細胞濃度。隨後冷凍細胞以運送至遞送點。

方案2：自個體獲得白血球清除術單元。自該單元分離PBMC且冷凍在包含血漿-Lyte™中之40% v/v HSA及5% w/v DMSO之調配物中。在第0天，融化PBMC且培養，且在G-REX 100 mL培養燒瓶中在包含IL-4 (10 ng/mL)及CD40L (1 µg/mL)之IMDM培養基中引發APC誘導。在第1天，使用T細胞培養基活化PBMC內之T細胞，該T細胞培養基包含1 µg/mL之

衍生自至少一種病毒或腫瘤抗原之PepMix。在第2天，移除培養基且在包含55 ng/mL IL-4、50 ng/mL IL-7及9 ng/mL IL-15之替代T細胞培養基中擴增T細胞。在第5天，用包含50 ng/mL IL-7及9 ng/mL IL-15之T細胞培養基替代培養基，且再將細胞培養七天。在第13天，收集T細胞，將其用離心機濃縮且用包含10% v/v HSA之血漿-Lyte™洗滌至少一次。隨後用包含10% v/v HSA及6% w/v聚葡萄糖-40之血漿-Lyte™再懸浮細胞，且用相同溶液將其稀釋至 $8-35 \times 10^6$ 個細胞/毫升之中間細胞濃度。細胞穿過60 μ m直列式濾網(in line strainer)後，用包含血漿-Lyte™ (32% v/v)、0.17% w/v NaCl、5.5% w/v聚葡萄糖-40、10% w/v HSA及5% v/v DMSO之溶液使細胞達至 $1-20 \times 10^6$ 個細胞/毫升之最終細胞濃度。隨後冷凍細胞以運送至遞送點。

方案3：自個體獲得白血球清除術單元(leukapheresis unit)。自該單元分離PBMC且洗滌，且冷凍在包含血漿-Lyte™中之40% v/v HSA及5% w/v DMSO之調配物中。在第0天，融化PBMC且培養，且在WAVE 100 mL生物反應器中在包含IL-4 (10 ng/mL)及CD40L (1 μ g/mL)之IMDM培養基中引發APC誘導。在第1天，使用T細胞培養基活化PBMC內之T細胞，該T細胞培養基包含1 μ g/mL之衍生自至少一種病毒或腫瘤抗原之PepMix。在第2天，移除培養基且在包含55 ng/mL IL-4、50 ng/mL IL-7及9 ng/mL IL-15之替代T細胞培養基中擴增T細胞。在第5天，用包含50 ng/mL IL-7及9 ng/mL IL-15之T細胞培養基替代培養基，且再將細胞培養七天。在第13天，收集T細胞，濃縮，使用Lovo細胞處理系統(Fresenius Kabi)用包含10% v/v HSA之血漿-Lyte™洗滌至少一次。隨後用包含10% v/v HSA及6% w/v聚葡萄糖-40之血漿-Lyte™再懸浮細胞，且用相同溶液

將其稀釋至 $8-35 \times 10^6$ 個細胞/毫升之中間細胞濃度。細胞穿過 $60 \mu\text{m}$ 直列式濾網後，用包含血漿-Lyte™ (32% v/v)、0.17% w/v NaCl、5.5% w/v 聚葡萄糖-40、10% w/v HSA及5% v/v DMSO之溶液使細胞達至 $1-20 \times 10^6$ 個細胞/毫升之最終細胞濃度。隨後冷凍細胞以運送至遞送點。

方案4：自個體獲得白血球清除術單元。自該單元分離PBMC且使用Cell Saver 5離心機洗滌，且冷凍在包含血漿-Lyte™ (32% v/v)中之10% w/v HSA及5% v/v DMSO之調配物中。在第0天，融化PBMC且培養，且在Grexx 100 mL培養裝置中在包含IL-4 (10 ng/mL)及CD40L (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)之IMDM培養基中引發APC誘導。在第1天，使用T細胞培養基在Grexx裝置中活化PBMC內之T細胞，該T細胞培養基包含1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之衍生自至少一種病毒或腫瘤抗原之PepMix，例如各自為1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之HPV16及HPV18 E6及E8蛋白PepMix。在第2天，用包含55 ng/mL IL-4、50 ng/mL IL-7及9 ng/mL IL-15之替代T細胞培養基(添加至現有培養基中)擴增T細胞。在第5、8及11天，在相同Grexx裝置中用包含50 ng/mL IL-7及9 ng/mL IL-15之T細胞培養基補充該培養基。在第13天，收集T細胞，且使用Lovo細胞處理系統(Fresenius Kabi)用包含10% v/v HSA之血漿-Lyte™洗滌至少一次。隨後用包含10% w/v HSA及6% w/v聚葡萄糖-40之血漿-Lyte再懸浮細胞，且用相同溶液將其稀釋至 $8-35 \times 10^6$ 個細胞/毫升之中間細胞濃度。隨後經由 $60 \mu\text{m}$ 直列式濾網過濾所得細胞懸浮液，且用包含血漿-Lyte™ 32% v/v、聚葡萄糖-40 5.5% w/v、HAS 10% w/v、NaCl 0.17% w/v及DMSO 5 %v/v之溶液將其稀釋至 $1-20 \times 10^6$ 個細胞/毫升。隨後將細胞懸浮液轉移至細胞儲存袋且冷凍以供後續使用。對於前述步驟，可用WAVE™生物反應器、靜態袋等取代Grexx裝置。

6.8 實例8：T細胞之功能表徵

測試如實例7中所產生之T細胞之功能特性。

正常患者及癌症患者中之**HPV16/18**。自五名宮頸癌患者-一個HPV 16及HPV 18陽性之健康供體及三個HPV狀態未知之健康供體-如實例7中所描述產生T細胞。隨後用HPV 16或HPV 18 E6或E7抗原肽，或來自HPV 16及HPV 18兩者之E6及E7抗原肽活化T細胞(圖27)。來自宮頸癌患者之T細胞對HPV 16及HPV 18抗原均作出回應，但尤其對HPV 16抗原作出回應。來自健康供體之T細胞對HPV 16及HPV 18抗原均作出回應，但尤其對HPV 16抗原作出回應。

活體外腫瘤殺滅。如實例7中所描述產生T細胞，且隨後在活體外針對自體標靶或HLA-A2匹配之標靶，以2.5:1、5:1、10:1、20:1及40:1之效應子與標靶之比率進行測試(圖28)。當用HPV脈衝自體標靶或HLA-A2匹配之標靶時，T細胞殺滅自體標靶(圖28A)及HLA-A2匹配之標靶(圖28B)。然而，當不用HPV脈衝靶細胞時，觀測到極少乃至無殺滅。

HPV抗原特異性及效應子活性。經由描述於實例7中之方案，在產生T細胞之前(PBMC)及之後(T細胞)測試來自七個供體之細胞。藉由量測CD137之表面表現來測試HPV抗原特異性(圖29A)。藉由量測IFN- γ (圖29B)、GM-CSF (圖29C)及TNF- α (圖29D)之分泌，在HPV刺激之PBMC及HPV或非HPV刺激之T細胞中量測效應子活性。僅T細胞而非衍生其之PBMC分泌促炎性Th1細胞介素。

6.9 實例9：T細胞之基因表現

此實例詳述獲自患者之PBMC與HPV特異性T細胞之間的基因表現差異，該等HPV特異性T細胞使用包含HPV16及HPV18 E6及E7蛋白質衍生

CDK5	細胞週期素依賴性激酶5	204247_s_at	46.05	細胞核	激酶	1020
CDK6	細胞週期素依賴性激酶6	235287_at	11.25	細胞核	激酶	1021
CDT1	染色質許可及DNA複製因子1	209832_s_at	21.78	細胞核	其他	81620
CHEK2	檢查點激酶2	210416_s_at	14.75	細胞核	激酶	11200
MCM2	微型染色體保持複合物組分2	202107_s_at	7.11	細胞核	酶	4171
MCM3	微型染色體保持複合物組分3	201555_at	5.64	細胞核	酶	4172
MCM4	微型染色體保持複合物組分4	222037_at	22.71	細胞核	酶	4173
MCM5	微型染色體保持複合物組分5	201755_at	6.12	細胞核	酶	4174
PCNA	增殖細胞核抗原	201202_at	5.56	細胞核	酶	5111
POLA1	DNA聚合酶 α 1，催化次單位	204835_at	10.84	細胞核	酶	5422
PRIM1	引子酶(DNA)亞單位1	205053_at	8.49	細胞核	酶	5557
TOP2A	拓樸異構酶(DNA) II α	201291_s_at	76.5	細胞核	酶	7153
	T輔助細胞分化					
BCL6	B細胞CLL/淋巴瘤6	203140_at	5.7	細胞核	轉錄調節因子	604
CD80	CD80分子	1555689_at	18.46	質膜	跨膜受體	941
CD86	CD86分子	210895_s_at	8.98	質膜	跨膜受體	942
CD40LG	CD40配位體	207892_at	7.76	細胞外間隙	細胞介素	959
CXCR5	C-X-C基元趨化細胞素受體5	206126_at	7.45	質膜	G蛋白偶合受體	643
HLA-DMB	主要組織相容性複合體，II類，DM β	203932_at	6.2	質膜	跨膜受體	3109
HLA-DQA1	主要組織相容性複合體，II類，DQ α 1	212671_s_at	8.8	質膜	跨膜受體	3117
HLA-DQB1	主要組織相容性複合體，II類，DQ β 1	212998_x_at	6.55	質膜	其他	3119
HLA-DRA	主要組織相容性複合體，II類，DR α	208894_at	6.01	質膜	跨膜受體	3122
IFNGR1	干擾素 γ 受體1	242903_at	6.43	質膜	跨膜受體	3459
IL4	介白素4	207539_s_at	50.34	細胞外間隙	細胞介素	3565
IL5	介白素5	207952_at	153.37	細胞外間隙	細胞介素	3567
IL13	介白素13	207844_at	10.3	細胞外間隙	細胞介素	3596
IL12RB1	介白素12受體次單位 β 1	206890_at	5.34	質膜	跨膜受體	3594
IL12RB2	介白素12受體次單位 β 2	206999_at	5.88	質膜	跨膜受體	3595
IL21R	介白素21受體	219971_at	7.08	質膜	跨膜受體	50615
IL2RA	介白素2受體次單位 α	211269_s_at	24.53	質膜	跨膜受體	3559

IL2RG	介白素2 受體次單位 γ	204116_at	9.79	質膜	跨膜受體	3561
IL6ST	介白素6信號轉導子	212196_at	6.98	質膜	跨膜受體	3572
STAT1	信號轉導與轉錄活化 因子1	200887_s_at	6.22	細胞核	轉錄調節 因子	6772
TGFB1	轉型生長因子 β 1	203084_at	8.15	細胞外間隙	生長因子	7040
TGFBR2	轉型生長因子 β 受體2 芳基烴受體信號傳導	207334_s_at	12.04	質膜	激酶	7048
AHRR	芳基烴受體抑制子	229354_at	15.64	細胞核	其他	57491
ALDH18A1	醛去氫酶18家族成員 A1	217791_s_at	7.36	細胞質	激酶	5832
ALDH6A1	醛去氫酶6家族成員 A1	221590_s_at	5.07	細胞質	酶	4329
BAX	BCL2相關X，細胞凋 亡調節因子	208478_s_at	18.02	細胞質	轉運蛋白	581
CCNA1	細胞週期素A1	205899_at	5.2	細胞核	其他	8900
CCNA2	細胞週期素A2	203418_at	134.53	細胞核	其他	890
CCND3	細胞週期素D3	1562028_at	10.69	細胞核	其他	896
CCNE2	細胞週期素E2	205034_at	7.41	細胞核	其他	9134
CDK2	細胞週期素依賴性激 酶2	211804_s_at	6.86	細胞核	激酶	1017
CDK4	細胞週期素依賴性激 酶4	202246_s_at	5.09	細胞核	激酶	1019
CDK6	細胞週期素依賴性激 酶6	235287_at	11.25	細胞核	激酶	1021
CHEK2	檢查點激酶2	210416_s_at	14.75	細胞核	激酶	11200
CYP1A1	細胞色素P450家族1子 族A成員1	205749_at	5.98	細胞質	酶	1543
CYP1B1	細胞色素P450家族1子 族B成員1	202437_s_at	13.89	細胞質	酶	1545
DHFR	二氫葉酸還原酶	202533_s_at	119.7	細胞核	酶	1719
E2F1	E2F轉錄因子1	204947_at	6.82	細胞核	轉錄調節 因子	1869
FAS	Fas細胞表面死亡受體	216252_x_at	7.81	質膜	跨膜受體	355
FOS	Fos原癌基因，AP-1轉 錄因子次單位	209189_at	8.18	細胞核	轉錄調節 因子	2353
GSTA4	麩胱甘肽S-轉移酶 α 4	202967_at	11.95	細胞質	酶	2941
GSTM4	麩胱甘肽S-轉移酶 μ 4	204149_s_at	11.02	細胞質	酶	2948
IL1B	介白素1 β	39402_at	17.14	細胞外間隙	細胞介素	3553
JUN	Jun原癌基因，AP-1轉 錄因子次單位	201466_s_at	6.07	細胞核	轉錄調節 因子	3725
MGST2	微粒體麩胱甘肽S-轉 移酶2	204168_at	9.22	細胞質	酶	4258
MGST3	微粒體麩胱甘肽S-轉 移酶3	201403_s_at	10.44	細胞質	酶	4259
NQO1	NAD(P)H醌去氫酶1	201467_s_at	29.55	細胞質	酶	1728
NQO2	NAD(P)H醌去氫酶2	203814_s_at	5.95	細胞質	酶	4835

NRIP1	核受體相互作用蛋白1	202600_s_at	5.06	細胞核	轉錄調節因子	8204
POLA1	DNA聚合酶 α 1，催化次單位	204835_at	10.84	細胞核	酶	5422
RARA	視黃酸受體 α	211605_s_at	6.64	細胞核	配位體依賴性核受體	5914
TFDP1	轉錄因子Dp-1	212330_at	10.29	細胞核	轉錄調節因子	7027
TGFB1	轉型生長因子 β 1	203084_at	8.15	細胞外間隙	生長因子	7040
TGM2	轉麩胺醯胺酶2	201042_at	14.73	細胞質	酶	7052
細胞週期檢查點控制中之CHK蛋白						
ANAPC11	分裂後期促進複合物次單位11	226414_s_at	5.53	細胞質	酶	51529
CCNB1	細胞週期素B1	228729_at	109.94	細胞質	激酶	891
CCNB2	細胞週期素B2	202705_at	129.25	細胞質	其他	9133
CDC20	細胞分裂週期20	202870_s_at	77.39	細胞核	其他	991
CDC25A	細胞分裂週期25A	204695_at	22.51	細胞核	磷酸酶	993
CDC25C	細胞分裂週期25C	217010_s_at	22.79	細胞核	磷酸酶	995
CDK1	細胞週期素依賴性激酶1	203213_at	112.57	細胞核	激酶	983
CHEK2	檢查點激酶2	210416_s_at	14.75	細胞核	激酶	11200
ESPL1	額外紡錘體極體樣1 (extra spindle pole bodies like 1)，分離酶	204817_at	5.39	細胞核	肽酶	9700
FBXO5	F-盒蛋白5	218875_s_at	6.72	細胞核	酶	26271
KIF11	驅動蛋白家族成員11	204444_at	34.58	細胞核	其他	3832
KIF23	驅動蛋白家族成員23	204709_s_at	58.62	細胞質	其他	9493
PLK2	polo樣激酶2	201939_at	13.28	細胞核	激酶	10769
PLK3	polo樣激酶3	204958_at	10.76	細胞核	激酶	1263
PLK4	polo樣激酶4	204887_s_at	13.84	細胞質	激酶	10733
PPM1L	蛋白質磷酸酶，Mg ²⁺ /Mn ²⁺ 依賴性1L	228108_at	6.25	細胞質	磷酸酶	151742
PPP2R3B	蛋白質磷酸酶2調節次單位B" β	219264_s_at	13.75	細胞核	磷酸酶	28227
PRC1	細胞質分裂之蛋白質調節因子1	218009_s_at	6.28	細胞核	其他	9055
PTTG1	垂體腫瘤轉化基因1	203554_x_at	12.57	細胞核	轉錄調節因子	9232
TGFB1	轉型生長因子 β 1	203084_at	8.15	細胞外間隙	生長因子	7040
共濟失調-毛細血管擴張突變(ATM)信號傳導						
BRCA1	BRCA1，與DNA修復相關	204531_s_at	79.8	細胞核	轉錄調節因子	672
CCNB1	細胞週期素B1	228729_at	109.94	細胞質	激酶	891
CCNB2	細胞週期素B2	202705_at	129.25	細胞質	其他	9133

CDC25A	細胞分裂週期25A	204695_at	22.51	細胞核	磷酸酶	993
CDC25C	細胞分裂週期25C	217010_s_at	22.79	細胞核	磷酸酶	995
CDK1	細胞週期素依賴性激酶1	203213_at	112.57	細胞核	激酶	983
CDK2	細胞週期素依賴性激酶2	211804_s_at	6.86	細胞核	激酶	1017
CHEK2	檢查點激酶2	210416_s_at	14.75	細胞核	激酶	11200
GADD45B	生長停滯及DNA損害誘導型β	209304_x_at	5.72	細胞質	其他	4616
JUN	Jun原癌基因，AP-1轉錄因子次單位	201466_s_at	6.07	細胞核	轉錄調節因子	3725
RAD50	RAD50雙股斷裂修復蛋白	208393_s_at	8.4	細胞核	酶	10111
RAD51	RAD51重組酶	205024_s_at	28.78	細胞核	酶	5888
RBBP8	RB結合蛋白8，核酸內切酶	203344_s_at	9.37	細胞核	酶	5932
SMC2	染色體結構保持2	204240_s_at	41.75	細胞核	轉運蛋白	10592
ZEB1	鋅指E-盒結合同源盒1	212758_s_at	5.16	細胞核	轉錄調節因子	6935
ZNF420	鋅指蛋白420 藉由病毒之NF-κB活化	238937_at	5.07	細胞質	其他	147923
CXCR5	C-X-C基元趨化細胞素受體5	206126_at	7.45	質膜	G蛋白偶合受體	643
FGFR1	纖維母細胞生長因子受體1	210973_s_at	5.49	質膜	激酶	2260
IRS2	胰島素受體受質2	209184_s_at	7	細胞質	酶	8660
ITGA1	整合素次單位α 1	214660_at	5.14	質膜	其他	3672
ITGA4	整合素次單位α 4	243366_s_at	12.85	質膜	跨膜受體	3676
ITGA5	整合素次單位α 5	201389_at	7.35	質膜	跨膜受體	3678
ITGA6	整合素次單位α 6	201656_at	5.16	質膜	跨膜受體	3655
ITGAL	整合素次單位α L	1554240_a_at	5.11	質膜	跨膜受體	3683
ITGB1	整合素次單位β 1	1553530_a_at	5.18	質膜	跨膜受體	3688
PIK3C2A	2型磷脂醯環己六醇-4-磷酸3-激酶催化次單位α	241905_at	6.37	細胞質	激酶	5286
PIK3CA	磷脂醯環己六醇-4,5-二磷酸3-激酶催化次單位α	204369_at	6.08	細胞質	激酶	5290
PRKD3	蛋白激酶D3	242549_at	5.7	細胞核	激酶	23683
RRAS	相關RAS病毒(r-ras)癌基因同源物	212647_at	12.45	細胞質	酶	6237
絲胺酸及甘胺酸生物合成之超路徑						
PHGDH	磷酸甘油酸去氫酶	201397_at	7.01	細胞質	酶	26227
PSAT1	磷絲胺酸胺基轉移酶1	223062_s_at	81.37	細胞質	酶	29968
PSPH	磷絲胺酸磷酸酶	205194_at	24.17	細胞質	磷酸酶	5723

SHMT1	絲胺酸經甲基轉移酶1	209980_s_at	23.92	細胞質	酶	6470
SHMT2	絲胺酸經甲基轉移酶2	214437_s_at	10.33	細胞質	酶	6472
與病毒進入有關之內吞路徑						
ACTA2	肌動蛋白, α 2, 平滑 肌, 主動脈	200974_at	5.58	細胞質	其他	59
AP2B1	接附子相關蛋白複合 物2 β 1次單位	200615_s_at	12.33	質膜	轉運蛋白	163
CXADR	科沙奇病毒(coxsackie virus)及腺病毒受體	226374_at	5.21	質膜	跨膜受體	1525
FGFR1	纖維母細胞生長因子 受體1	210973_s_at	5.49	質膜	激酶	2260
FYN	FYN原癌基因, Src家 族酪胺酸激酶	1559101_at	11.42	質膜	激酶	2534
IRS2	胰島素受體受質2	209184_s_at	7	細胞質	酶	8660
ITGA1	整合素次單位 α 1	214660_at	5.14	質膜	其他	3672
ITGA4	整合素次單位 α 4	243366_s_at	12.85	質膜	跨膜受體	3676
ITGA5	整合素次單位 α 5	201389_at	7.35	質膜	跨膜受體	3678
ITGA6	整合素次單位 α 6	201656_at	5.16	質膜	跨膜受體	3655
ITGAL	整合素次單位 α L	1554240_a_at	5.11	質膜	跨膜受體	3683
ITGB1	整合素次單位 β 1	1553530_a_at	5.18	質膜	跨膜受體	3688
ITGB7	整合素次單位 β 7	205718_at	6.63	質膜	跨膜受體	3695
PIK3C2A	2型磷脂醯環己六醇- 4-磷酸3-激酶催化次 單位 α	241905_at	6.37	細胞質	激酶	5286
PIK3CA	磷脂醯環己六醇-4,5- 二磷酸3-激酶催化次 單位 α	204369_at	6.08	細胞質	激酶	5290
PRKD3	蛋白激酶D3	242549_at	5.7	細胞核	激酶	23683
RAC2	ras相關C3肉毒桿菌毒 素受質2 (ρ 家族, 小 GTP結合蛋白Rac2)	207419_s_at	10.13	細胞質	酶	5880
RAC3	ras相關C3肉毒桿菌毒 素受質3 (ρ 家族, 小 GTP結合蛋白Rac3)	206103_at	6.24	細胞質	酶	5881
RRAS	相關RAS病毒(r-ras)癌 基因同源物	212647_at	12.45	細胞質	酶	6237
可拉酸生物合成						
GALK1	半乳糖激酶1	204374_s_at	30.31	細胞質	激酶	2584
GALK2	半乳糖激酶2	205219_s_at	5.7	細胞質	激酶	2585
GMDS	GDP-甘露糖4,6-去水 酶	204875_s_at	7.34	細胞質	酶	2762
GMPPA	GDP-甘露糖焦磷酸 化酶A	218070_s_at	5.74	細胞質	酶	29926
TSTA3	組織特異性移植抗原 P35B	201644_at	5.26	質膜	酶	7264

UGDH	UDP-葡萄糖6-去氫酶 次亞麻油酸酯生物合成	203343_at	10.71	細胞核	酶	7358
ACSL5	醯基-CoA合成酶長鏈 家族成員5	222592_s_at	7.34	細胞質	酶	51703
ACSL6	醯基-CoA合成酶長鏈 家族成員6	229725_at	6.49	細胞質	酶	23305
CYB5A	A型細胞色素b5	215726_s_at	7.26	細胞質	酶	1528
FADS1	脂肪酸去飽和酶1	208962_s_at	35.99	質膜	酶	3992
FADS2	脂肪酸去飽和酶2	202218_s_at	25.1	質膜	酶	9415
SLC27A2	溶質載體家族27成員2 無粒白血球黏著及血球滲出	205768_s_at	27.09	細胞質	轉運蛋白	11001
ACTA2	肌動蛋白, α 2, 平滑 肌, 主動脈	200974_at	5.58	細胞質	其他	59
C5	補體組分5	205500_at	6.47	細胞外間隙	細胞介素	727
CCL4	C-C基元趨化細胞素 配位體4	204103_at	6.29	細胞外間隙	細胞介素	6351
CCL13	C-C基元趨化細胞素 配位體13	206407_s_at	5.68	細胞外間隙	細胞介素	6357
CCL17	C-C基元趨化細胞素 配位體17	207900_at	25.39	細胞外間隙	細胞介素	6361
CCL18	C-C基元趨化細胞素 配位體18	209924_at	21.71	細胞外間隙	細胞介素	6362
CCL20	C-C基元趨化細胞素 配位體20	205476_at	18.69	細胞外間隙	細胞介素	6364
CCL22	C-C基元趨化細胞素 配位體22	207861_at	20.55	細胞外間隙	細胞介素	6367
CKLF	趨化細胞素樣因子	223451_s_at	30.79	細胞外間隙	細胞介素	51192
CXCL2	C-X-C基元趨化細胞 素配位體2	209774_x_at	94.66	細胞外間隙	細胞介素	2920
CXCL8	C-X-C基元趨化細胞 素配位體8	202859_x_at	27.39	細胞外間隙	細胞介素	3576
CXCL16	C-X-C基元趨化細胞 素配位體16	223454_at	7.09	細胞外間隙	細胞介素	58191
FN1	纖維結合蛋白1	211719_x_at	14.42	細胞外間隙	酶	2335
IL1B	介白素 1 β	39402_at	17.14	細胞外間隙	細胞介素	3553
ITGA1	整合素次單位 α 1	214660_at	5.14	質膜	其他	3672
ITGA4	整合素次單位 α 4	243366_s_at	12.85	質膜	跨膜受體	3676
ITGA5	整合素次單位 α 5	201389_at	7.35	質膜	跨膜受體	3678
ITGA6	整合素次單位 α 6	201656_at	5.16	質膜	跨膜受體	3655
ITGB1	整合素次單位 β 1	1553530_a_at	5.18	質膜	跨膜受體	3688
ITGB7	整合素次單位 β 7	205718_at	6.63	質膜	跨膜受體	3695
JAM3	連接黏著分子3	212813_at	12.14	質膜	其他	83700
MMP25	基質金屬蛋白酶25	207890_s_at	13.29	質膜	肽酶	64386
MYL6B	肌凝蛋白輕鏈6B	204173_at	11.23	細胞質	其他	140465
SDC4	多配體蛋白聚糖4	202071_at	5.93	質膜	其他	6385

SELPLG	選擇素P配位體	209880_s_at	9.3	質膜	其他	6404
XCL1	X-C基元趨化細胞素配位體1	206366_x_at	18.61	細胞外間隙	細胞介素	6375
XCL2	X-C基元趨化細胞素配位體2	214567_s_at	24.97	細胞外間隙	細胞介素	6846
胞膜窖介導之細胞內信號傳導						
ACTA2	肌動蛋白， α 2，平滑肌，主動脈	200974_at	5.58	細胞質	其他	59
COPG2	外被體蛋白複合物次單位 γ 2	223457_at	5.24	細胞質	轉運蛋白	26958
FLOT1	脂筏標記蛋白 (flotillin) 1	208748_s_at	21.43	質膜	其他	10211
FYN	FYN原癌基因，Src家族酪胺酸激酶	1559101_at	11.42	質膜	激酶	2534
ITGA1	整合素次單位 α 1	214660_at	5.14	質膜	其他	3672
ITGA4	整合素次單位 α 4	243366_s_at	12.85	質膜	跨膜受體	3676
ITGA5	整合素次單位 α 5	201389_at	7.35	質膜	跨膜受體	3678
ITGA6	整合素次單位 α 6	201656_at	5.16	質膜	跨膜受體	3655
ITGAL	整合素次單位 α L	1554240_a_at	5.11	質膜	跨膜受體	3683
ITGAX	整合素次單位 α X	210184_at	9.34	質膜	跨膜受體	3687
ITGB1	整合素次單位 β 1	1553530_a_at	5.18	質膜	跨膜受體	3688
ITGB7	整合素次單位 β 7	205718_at	6.63	質膜	跨膜受體	3695
MAP3K2	有絲分裂原活化蛋白三激酶2	227073_at	5.83	細胞質	激酶	10746

在單獨實驗中，使用來自10個健康供體之PBMC產生十種HPV T細胞株及過程對照細胞(沒有暴露於HPV PepMix之T細胞)。自HPV T細胞、過程對照細胞及其供體匹配之PBMC純化Pan T細胞。自30個樣品提取RNA。藉由使用Affymetrix U133A Plus 2.0陣列表徵經純化T細胞之基因表現概況。使用管家基因(β -2-微球蛋白(B2M)、次黃嘌呤磷酸核糖轉移酶(hypoxanthine phosphoribosyltransferase, HPRT)及大核糖體蛋白(RPLPO))藉由標準化獲得基因表現之倍數變化，隨後比較樣品之間的表現量。與HPV T細胞匹配之PBMC及/或過程對照細胞相比，在HPV T細胞中數千種基因有差異地表現。選擇六種差異表現之基因以使用TaqMan基因表現分析藉由定量即時PCR來驗證。為比較，使用未經脈衝之T細胞(亦即在不存在HPV16及HPV18 E6及E7蛋白質下產生之T細胞)。在此實

驗中，鑑別六種差異表現之基因：CCL18 (趨化細胞素(C-C基元)配位體18)；CH13L1 (類殼質酶-3蛋白質)；FN1 (纖維結合蛋白1)；LYZ (溶菌酶)；RCHY1 (環指及CHY鋅指1)；及PALLD (帕拉丁，細胞骨架相關蛋白質)。相較於對照未經脈衝之T細胞(來自其匹配之供體)，在HPV T細胞群體中，CCL18、CHI3L1、FN1及PALLD顯著(至少5倍)上調，且LYZ及RCHY1顯著(至少5倍)下調。

6.10 實例10：患者PBMC樣品中之T細胞之ELISPOT分析

此實例描述一種定量患者PBMC樣品中之HPV特異性T細胞之分析。該分析亦可用以揭露抗原特異性T細胞(例如細胞毒性T淋巴球)之頻率及細胞介素標誌，及用以定量PBMC中回應於HPV抗原刺激的抗原特異性T細胞。

材料：來自患者之冷凍保存之PBMC；磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)，pH 7.2 (Invitrogen，目錄號20012027)；Tween-20 (Sigma，目錄號P2287)；RPMI 1640培養基(ATCC，目錄號ATCC30-2001)；人類IFN- γ ELISPOT集(BD Biosciences，目錄號551849)-集組分：51-2555KC純化之NA/LE抗人類IFN- γ ；51-1890KC生物素標記之抗人類IFN- γ ；51-2447KC BD ELISPOT盤；及51-9000209抗生蛋白鏈菌素-HRP；BD™ AEC受質試劑集(BD Biosciences，目錄號551951)；CTL-Anti-Aggregate Wash™培養基(CTL，目錄號CTL-AA-005)；CTL-Test Plus培養基(CTL，目錄號CTLTP-005)；及人類AB血清(Sigma，目錄號：H3667-100ML)。

抗原：使用等量之以下各物在蒸餾水中將TAA抗原溶液製成各自100 ug/ml：PepTivator HPV16E6 (Miltenyi，目錄號130-095-998)；PepTivator HPV16E7 (Miltenyi，目錄號130-096-000)；PepTivator

HPV18E6 (Miltenyi, 目錄號 130-096-006) ; PepTivator HPV18E7 (Miltenyi, 目錄號130-096-007)。

設備：ViCell (Beckman Coulter, Fullerton, CA) ; AID EliSpot讀取器(AID GmbH, Strassberg, Germany)。

製備培養基及緩衝液. 包被緩衝液：用PBS以1:200稀釋捕捉抗體儲備液(儲備液：純化之NA/LE抗人類IFN γ , 1 mg/ml)。阻斷緩衝液：在RPMI1640中製備5% v/v人類AB血清。洗滌緩衝液I：例如藉由將0.5 ml Tween-20添加於1 L PBS中來製備含有0.05% Tween-20之1 \times PBS。洗滌緩衝液II：1 \times PBS。稀釋緩衝液：含有5%人類AB血清之1 \times PBS。受質溶液：在使用前不多於15分鐘，將一滴(20 μ l) AEC色原體與各1 ml之AEC受質混合，且充分地混合。

實驗程序：如下將對IFN γ 具有特異性之捕捉抗體包被在96孔PVDF培養盤上。藉由用PBS以1:200稀釋捕捉抗體儲備液(儲備液：純化之NA/LE抗人類IFN γ , 1 mg/ml)來製備包被緩衝液。藉由將100 μ l包被緩衝液添加至96孔培養盤之各孔中來包被培養盤。隨後在4 $^{\circ}$ C下儲存培養盤隔夜。隨後用阻斷緩衝液阻斷培養盤。將阻斷緩衝液製備為含5%人類AB血清之RPMI1640，例如藉由將25 ml人類AB血清添加於475 ml RPMI1640中來製備。丟棄過量包被抗體。將200微升/孔阻斷溶液添加至各孔中且在室溫下培育2小時。

隨後用HPV抗原活化細胞。培養盤抗原溶液：將HPV抗原以2 μ g/ml稀釋於CTL-Test Plus培養基中，以例如藉由將25 μ l抗原儲備溶液添加於5 ml培養基中來製備5 ml抗原溶液。傾析阻斷緩衝液，且將50 μ l抗原溶液添加於96孔培養盤之各孔中，且將培養盤在37 $^{\circ}$ C下培育10-20分鐘，之

後塗覆細胞。藉由在50 ml錐形管中解凍PBMC來塗覆PBMC，且藉由緩慢添加預溫熱之37°C Anti-Aggregate培養基來稀釋細胞。在400 g下離心PBMC 5分鐘，傾析清液層，且將所得細胞集結粒再懸浮於anti-Aggregate培養基中。使用ViCell確定細胞數目。離心PBMC且將其以2,000萬個細胞/毫升再懸浮於CTL-Test Plus培養基中。如下表14所指示，在新U底96孔培養盤中製備PBMC懸浮液自最高濃度的1.5倍連續稀釋液。各細胞濃度較佳重複三次。

表14. PBMC懸浮液之連續稀釋液

PBMC數目 /50 ul	培養基體積 (ul)	連續稀釋液之 PBMC體積	稀釋液
0.75	0	180	1.5倍之 連續稀 釋液
0.50	60	120	
0.33	60	120	
0.22	60	120	
0.15	60	120	
0.10	60	120	
0.07	60	120	
0.04	60	120	

將50 μ l 不同密度之PBMC轉移至分析培養盤中，該分析培養盤立即置放於37°C 培育箱中。隨後在無干擾的情況下將培養盤培育48小時。使用生物素標記之抗人類IFN γ (偵測抗體)偵測所捕捉之細胞介素(IFN γ)。抽吸細胞懸浮液，用去離子水洗滌孔2次，且用200微升/孔洗滌緩衝液I洗滌3次。在稀釋緩衝液中製備1:250偵測抗體，以藉由將400 μ l 0.5mg/ml 偵測抗體儲備液添加於100 ml稀釋緩衝液中來製備2 μ g/ml偵測抗體溶液。每孔添加100 μ l且在室溫下培育2小時。

使用含1:100酶結合物(抗生蛋白鏈菌素-HRP)之稀釋緩衝液，添加100微升/孔經稀釋酶試劑且在室溫下培育1小時，藉由顯色目測分泌之細胞介素。隨後丟棄酶結合物溶液，且用200微升/孔洗滌緩衝液I洗滌孔4

次，且用200微升/孔洗滌緩衝液II洗滌2次。隨後將100 μ l最終受質溶液添加至各孔中，且監測顯色5-60分鐘。藉由用DI水洗滌孔使反應停止，且風乾培養盤直至完全乾燥。使用具有根據製造商說明書選擇之IFN γ 斑點讀取程式之AID EliSpot讀取器計數所得斑點。

6.11 實例11：臨床研究方案

此實例描述在具有或不具有放射療法之在一線化學療法後，患有HPV+復發性及/或轉移性頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)之個體中人類外周血液衍生、培養物擴增、自體之T細胞輸注的1期、多中心、開放標記、劑量遞增之安全性研究。

出於此研究的目的，一線療法為經投與以用於診斷復發性疾病或轉移性疾病的第一治療。該研究招收多達84名個體。該研究由以下各者組成：預標準護理篩選時間段；標準護理治療時間段；T細胞篩選時間段；T細胞治療時間段(第-4天至第0天)，其包括3天調理治療(第-4天至第-2天)及第0天之T細胞輸注；及在第1天開始至進行性疾病(PD)之時間之隨訪時間段。長期隨訪時間段在PD或新療法開始後開始，且包括收集如下信息：存活率及針對SCCHN每三個月投與之其他療法，直至死亡、失訪或撤回同意，而不論哪一個先發生。個體之預期參與時間為五年。

個體患有復發性及/或轉移性口咽癌，如藉由免疫組織化學、聚合酶鏈反應或核糖核酸螢光原位雜交所確定，其為p16及/或HPV-16及/或HPV-18陽性的。

該研究之主要目標為分析安全性，且確定靜脈內(IV)投與個體中之T細胞之最大耐受劑量(MTD)，該個體患有如由美國國家綜合癌症網絡(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)指南所定義之HPV+

復發性及/或轉移性SCCHN。

該研究之次要目標為藉由評定如藉由實體腫瘤之反應評估準則(RECIST v1.1)指南所量測之腫瘤反應，且藉由評定疾病控制之持續時間及速率、無進展存活期(PFS)及總體存活期(OS)，來探究潛在臨床功效，且評估如藉由安全性所量測之預指定淋巴球耗盡療程之耐受性。

該研究調查多達5個劑量-水準群組，使用僅低環磷醯胺(LD-Cy)療程用於淋巴球耗盡。一旦鑑定出T細胞之MTD，研究兩種替代性淋巴球耗盡療程，高劑量環磷醯胺(HD-Cy)與環磷醯胺及氟達拉濱(Cy-Flu)。

出於製造T細胞的目的，個體經歷白血球清除術。在個體經歷白血球清除術後，由治療醫師判斷，個體接受如醫學上所指示之一線療法，例如在標準護理實踐後，個體可接受多達6週期之化學療法。在一線療法期間，個體經歷由治療醫師執行的臨床及放射性疾病評估。基於全部資料，治療醫師可建議發起人為個體製造T細胞。

隨後製造、測試且釋放個體特異性T細胞，以在大約28天之過程裏使用。根據本文所描述之方法製造T細胞。一旦T細胞經成功製造且釋放以供使用，個體可開始治療，治療時序由治療醫師判斷，但在一線化學療法完成後進行。為了適應一線療法時長之變化及早期進展之可能性，個體可在不知T細胞治療日期的情況下加入該研究以經歷白血球清除術。

該研究招收最多達84名經T細胞治療之個體。在針對劑量遞增之任何建議之前，針對各劑量水準群組，研究不少於3名劑量限制性毒性(DLT)可評估個體。在DLT之情況下，對群組進行擴大且在劑量水準群組遞增之前研究不少於6名DLT可評估個體。在2 DLT發生之情況下，該特定群組停止招收，此時評估MTD建議。由於一線療法之持續時間不同，且個體

可能不用T細胞治療，因此不超過18名個體可在無T細胞治療或無該研究遞增階段期間之任何既定時間下之早期終止的情況下經歷白血球清除術。一旦鑑定出調理療程(conditioning regimen)及T細胞之MTD，擴大招收18名個體以提供其他安全性信息且貢獻於其他功效資料。

T細胞治療時間段開始於在第-4天開始至第-2天的三天淋巴球耗盡療程。最初使用單一藥劑療程，尤其包括在第-4天至第-2天投與之300毫克/平方公尺/天環磷醯胺之LD-Cy。在第0天投與T細胞。各個體接受單次劑量之可能需要多個輸注袋之T細胞。

基於進入該研究之時間，將個體依序指派給多達五個給藥群組中之一者：

- 劑量水準1： 5.0×10^7 個細胞/平方公尺
- 劑量水準2： 1.5×10^8 個細胞/平方公尺
- 劑量水準3： 4.5×10^8 個細胞/平方公尺
- 劑量水準4： 1.3×10^9 個細胞/平方公尺
- 劑量水準5： 2.0×10^9 個細胞/平方公尺

一旦鑑定出T細胞之MTD，基於治療時間段進入之時間，同時研究兩種替代性淋巴球耗盡療程。HD-Cy，其包括在第-4天開始至第-2天用於三天之900毫克/平方公尺/天之更高劑量的環磷醯胺，或Cy-Flu，其包括用於三天之環磷醯胺300毫克/平方公尺/天以及在第-4天開始至第-3天用於兩天之氟達拉濱30毫克/公斤/天。

在T細胞輸注之前及T細胞輸注後大約4小時，用乙醯胺苯酚650 mg (經口) (PO)及苯海拉明25 mg (PO/IV/肌內[IM])對個體預給藥。T細胞輸注結束後，監測個體至少24小時。

增加群組規模之決定基於DLT事件之數量。對於第一群組，不超過1名個體可在任何14天時間段裏開始治療。

在研究治療方案之整個投藥期間，密切監測個體之不良反應。若在T細胞輸注期間出現不良事件(AE)，並有可能變得嚴重(如國家癌症學會[National Cancer Institute, NCI])不良事件之普通專業術語標準(Common Terminology Criteria) [CTCAE] 4.03版3級或更高級所定義；或指示緊急干預以預防嚴重性增加而有可能危及生命)，則停止輸注且繼續跟蹤個體。

T細胞投與完成後，跟蹤個體直至PD。此後，跟蹤個體之存活率直至死亡、失訪或撤回同意，而不論哪一個先發生。

等效物

本發明之範疇不受本文所描述之特定實施例限制。實際上，本文提供之標的物的各種修改，除所述彼等修改之外，將由以上描述而變得對熟習此項技術者顯而易見。此類修改意欲屬於隨附申請專利範圍之範疇內。

本文引用各種公開案、專利及專利申請案，其揭示內容以全文引用的方式併入。



201734204

申請日: 105/12/30

IPC分類: **G12N 5/0783** (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明摘要】

【中文發明名稱】

T淋巴球生產方法及由此製得的T淋巴球

【英文發明名稱】

T LYMPHOCYTE PRODUCTION METHODS AND T
LYMPHOCYTES PRODUCED THEREBY

【中文】

本發明提供產生例如細胞毒性T淋巴球之T細胞之方法，該方法在沒有分開產生及分離抗原呈遞細胞之步驟的情況下，且在單次之抗原刺激下，自外周血液單核細胞開始進行。本文亦提供使用該等細胞毒性T淋巴球來例如治療癌症及/或病毒感染之方法。

【英文】

Provided herein are methods of generating T cells, *e.g.*, cytotoxic T lymphocytes starting from peripheral blood mononuclear cells without a separate step of generating and isolating antigen-presenting cells, and with a single round of antigen stimulation. Also provided herein are methods of using said cytotoxic T lymphocytes, for example, to treat cancer and/or viral infection.

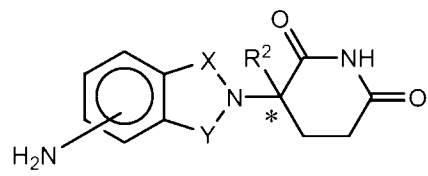
【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種生產細胞群體之方法，該細胞群體包含抗原特異性T細胞，例如細胞毒性T淋巴球(CTL)，該方法包含以下步驟：

(a) 自個體分離外周血液單核細胞(PBMC)；

(b) 在抗原呈遞細胞(APC)誘導培養基中培養該等PBMC，以生產第一細胞群體，該抗原呈遞細胞誘導培養基包含介白素4 (IL-4)及可溶性CD40配位體(sCD40L)及/或包含粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)及干擾素 α (IFN- α)；

(c) 在一或多種抗原存在下培養該第一細胞群體，以生產第二細胞群體；及

(d) 在包含介白素7 (IL-7)、介白素15 (IL-15)及IL-4之T細胞擴增培養基中培養該第二細胞群體，以生產第三細胞群體；

其中該第三細胞群體包含T細胞，其為CD3+且對步驟(c)中所添加之抗原具有特異性。

【第2項】

如請求項1之方法，其中該第三細胞群體包含另外為CD4+之T細胞。

【第3項】

如請求項1或2之方法，其中該第三細胞群體包含另外為CD8+之T細胞。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之方法，其中該APC誘導培養基包含IL-4及sCD40L。

【第5項】

如請求項1至4中任一項之方法，其進一步包含如下步驟：在包含IL-7及IL-15但不包含IL-4之第二T細胞擴增培養基中培養該第三細胞群體，以產生第四細胞群體；其中該第四細胞群體包含T細胞，其為CD3+且對步驟(c)中所添加之抗原具有特異性。

【第6項】

如請求項1至5中任一項之方法，其中該一或多種抗原為凍乾肽之集合庫。

【第7項】

如請求項1至6中任一項之方法，其中該凍乾肽集合庫涵蓋人類HPV16E6、HPV16E7、HPV18E6及HPV18E7蛋白質之完整序列。

【第8項】

如請求項6或7之方法，其中該等肽之濃度為1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

【第9項】

如請求項1至8中任一項之方法，其中該APC誘導培養基包含8-12 ng/mL IL-4及0.8-1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sCD40L。

【第10項】

如請求項9之方法，其中該APC誘導培養基包含10 ng/mL IL-4及1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sCD40L。

【第11項】

如請求項1至10中任一項之方法，其中該T細胞擴增培養基包含40-60 ng/mL IL-7、7-11 ng/mL IL-15及45-65 ng/mL IL-4。

【第12項】

如請求項11之方法，其中該T細胞擴增培養基包含50 ng/mL IL-7、9 ng/mL IL-15及55 ng/mL IL-4。

【第13項】

如請求項5至12中任一項之方法，其中該第二T細胞擴增培養基包含40-60 ng/mL IL-7及7-11 ng/mL IL-15。

【第14項】

如請求項13之方法，其中該第二T細胞擴增培養基包含50 ng/mL IL-7及9 ng/mL IL-15。

【第15項】

如請求項1至14中任一項之方法，其中步驟(b)之持續時間為1-3天。

【第16項】

如請求項15之方法，其中步驟(b)之持續時間為1天。

【第17項】

如請求項1至16中任一項之方法，其中該等PBMC係自全血、白血球層或富集之白血球清除術產物分離。

【第18項】

如請求項1至17中任一項之方法，其進一步包含自該第三細胞群體或該第四細胞群體分離為CD3⁺之T細胞之步驟。

【第19項】

如請求項1至18中任一項之方法，其中該等抗原特異性CD3⁺細胞藉由胞內細胞介素染色(ICCS)鑑別。

【第20項】

如請求項1至19中任一項之方法，其中步驟(c)在APC誘導培養基中進

行。

【第21項】

如請求項1至20中任一項之方法，其中該等培養步驟在G-REX®裝置中進行。

【第22項】

如請求項4至21中任一項之方法，其中該APC誘導培養基進一步包含具有未甲基化之CpG二核苷酸基元之合成寡核苷酸。

【第23項】

如請求項22之方法，其中該APC誘導培養基進一步包含GM-CSF及IFN- α 。

【第24項】

如請求項1之方法，其中該APC誘導培養基包含GM-CSF及IFN- α 。

【第25項】

如請求項1至24中任一項之方法，其中步驟(d)之持續時間為8-16天。

【第26項】

如請求項25之方法，其中步驟(d)之持續時間為12天。

【第27項】

如請求項1至26中任一項之方法，其中該等PBMC以 $4-6 \times 10^6$ 個/平方公分之密度接種於該APC誘導培養基中。

【第28項】

如請求項27之方法，其中該等PBMC以 5×10^6 個/平方公分之密度接種。

【第29項】

一種抗原特異性T細胞群體，其藉由如請求項1至28中任一項之方法生產。

【第30項】

一種治療癌症或病毒感染之方法，其包含向有需要患者投與如請求項29之抗原特異性T細胞群體，其中該等分離之PBMC為該患者自體的。

【第31項】

一種治療癌症或病毒感染之方法，其包含向有需要患者投與如請求項29之抗原特異性T細胞群體，其中該等分離之PBMC不為該患者自體的。

【第32項】

如請求項30或31之方法，其中該病毒感染為人類乳突狀瘤病毒(HPV)。

【第33項】

如請求項30至32中任一項之方法，其中該方法進一步包含向該患者投與免疫調節藥物或表觀遺傳修飾劑。

【第34項】

如請求項30至32中任一項之方法，其中該方法進一步包含向該患者投與免疫檢查點抑制劑。

【第35項】

如請求項34之方法，其中該免疫檢查點抑制劑係選自由抗CTLA-4抗體、抗PD1抗體及抗PD-L1抗體組成之群。

【第36項】

如請求項30之方法，其中該癌症為HPV+癌症。

【第37項】

如請求項36之方法，其中該HPV+癌症為頭頸癌。

【第38項】

如請求項36之方法，其中該頭頸癌為頭頸部鱗狀細胞癌。

【第39項】

如請求項36之方法，其中該頭頸癌為口咽癌。

【第40項】

如請求項36至39中任一項之方法，其中該HPV+癌症為轉移性。

【第41項】

如請求項36至39中任一項之方法，其中該HPV+癌症為復發性。

【第42項】

如請求項36至39中任一項之方法，其中該HPV+癌症為轉移性及復發性。

【第43項】

如請求項36至42中任一項之方法，其中該方法進一步包含向該患者投與免疫調節藥物或表觀遺傳修飾劑。

【第44項】

如請求項36至42中任一項之方法，其中該方法進一步包含向該患者投與免疫檢查點抑制劑。

【第45項】

如請求項44之方法，其中該免疫檢查點抑制劑係選自由抗CTLA-4抗體、抗PD1抗體及抗PD-L1抗體組成之群。

【第46項】

如請求項29之群體，其中相較於沒有暴露於該等抗原之T細胞，該群體差異地表現一或多種基因，其中該等抗原來自HPV16及HPV18之E6及E7蛋白質，且其中該一或多種基因包含以下一或多者：CCL18 (趨化細胞素(C-C基元)配位體18)；CH13L1 (類殼質酶-3蛋白質)；FN1 (纖維結合蛋白1)；LYZ (溶菌酶)；RCHY1 (環指及CHY鋅指1)；及/或PALLD (帕拉丁(Palladin)，細胞骨架相關蛋白質)。

【第47項】

如請求項29之群體，其中相較於沒有暴露於該等抗原之T細胞，該群體差異地表現一或多種基因，其中該等抗原來自HPV16及HPV18之E6及E7蛋白質，且其中該一或多種基因包含以下一或多者：ACSL5、ACSL6、ACTA2、AHRR、ALDH18A1、ALDH6A1、ANAPC11、AP2B1、BAX、BCL6、BRCA1、C5、CCL13、CCL17、CCL18、CCL20、CCL22、CCL4、CCNA1、CCNA2、CCNB1、CCNB2、CCND3、CCNE2、CD40LG、CD80、CD86、CDC20、CDC25A、CDC25A、CDC25C、CDC45、CDC6、CDK1、CDK1、CDK2、CDK2、CDK4、CDK5、CDK6、CDT1、CHEK2、CKLF、COPG2、CXADR、CXCL16、CXCL2、CXCL8、CXCR5、CXCR5、CYB5A、CYP1A1、CYP1B1、DHFR、E2F1、ESPL1、FADS1、FADS2、FAS、FBXO5、FGFR1、FGFR1、FLOT1、FN1、FOS、FYN、FYN、GADD45B、GALK1、GALK2、GMDS、GMPPA、GSTA4、GSTM4、HLA-DMB、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DRA、IFNGR1、IL12RB1、IL12RB2、IL13、IL1B、IL1B、IL21R、IL2RA、IL2RG、

IL4、IL5、IL6ST、IRS2、IRS2、ITGA1、ITGA4、ITGA5、ITGA6、
ITGAL、ITGAX、ITGB1、ITGB7、JAM3、JUN、KIF11、KIF23、
MAP3K2、MCM2、MCM3、MCM4、MCM5、MGST2、MGST3、
MMP25、MYL6B、NQO1、NQO2、NRIP1、PCNA、PHGDH、
PIK3C2A、PIK3CA、PLK2、PLK3、PLK4、POLA1、PPM1L、
PPP2R3B、PRC1、PRIM1、PRKD3、PSAT1、PSPH、PTTG1、
RAC2、RAC3、RAD50、RAD51、RARA、RBBP8、RRAS、SDC4、
SELPLG、SHMT1、SHMT2、SLC27A2、SMC2、STAT1、TFDP1、
TGFB1、TGFBR2、TGM2、TOP2A、TSTA3、UGDH、XCL1、
XCL2、ZEB1及/或ZNF420。

